

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.05.0548

空气苯并[a]芘暴露对3~5岁学龄前儿童尿液神经递质含量的影响

罗 珑, 李 巍, 张孝英, 涂白杰*

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

[摘要] **目的** 调查不同区域空气中苯并[a]芘(B[a]P)暴露情况, 探讨接触 B[a]P 对 3~5 岁学龄前儿童尿液神经递质含量的影响。**方法** 利用高效液相色谱法测定重庆市主城区某焦化厂附近不同区域(分别距焦化厂 1 000、2 000、3 000、4 000 m)、不同季度空气中 B[a]P 暴露浓度; 收集出生于该地区且出生以来居住地固定的 3~5 岁学龄前儿童尿液样本, 用 ELISA 方法测定儿童尿液中谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)、多巴胺(DA)和 5-羟色胺(5-HT)的含量, 分析 B[a]P 暴露变化与儿童尿液神经递质含量改变的关系。**结果** 空气 B[a]P 浓度随着与污染源距离变大而降低, 同一季度 4 个不同区域整体比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 同一区域不同季度整体比较差异也有统计学意义($P < 0.05$)。儿童尿液神经递质(Glu、GABA、DA、5-HT)在同一暴露范围内随着年龄的增大而含量升高, 在同一年龄段 4 种神经递质的含量随着 B[a]P 暴露浓度的升高而降低。**结论** B[a]P 暴露可降低 3~5 岁儿童尿液神经递质 Glu、GABA、DA、5-HT 含量, 其因果关联还需要进一步调查研究。

[关键词] 苯并[a]芘; 尿; 神经递质; 儿童

[中图分类号] R 122.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)05-0548-04

Effect of air benzo(a)pyrene exposure on urine neurotransmitter level in 3-5 years old preschool children

LUO Long, LI Wei, ZHANG Xiao-ying, TU Bai-jie*

School of Public Health and Management, Center for Research of Medicine and Social Development, Innovation Center for Social Risk Governance in Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the concentrations of air benzo(a)pyrene in different areas and the effect of air benzo(a)pyrene exposure on urine neurotransmitter content in 3-5 years old preschool children. **Methods** The concentrations of air benzo(a)pyrene were detected by the high performance liquid chromatography (HPLC) in different areas (distances from a coking plant 1 000, 2 000, 3 000 and 4 000 m, respectively) and different seasons in a coking plant in the main city of Chongqing. The urine samples were collected from 3-5 years old children who were born in the areas and lived in the areas since birth; and their urine levels of glutamate (Glu), gamma-aminobutyric acid (GABA), dopamine (DA) and serotonin (5-HT) were determined by ELISA assay. Then the relationship between the air benzo(a)pyrene exposure changes and the contents of urine neurotransmitters was analyzed. **Results** The concentrations of air benzo(a)pyrene decreased with the increase of distance from the coking plant. There were significant differences in the concentrations of air benzo(a)pyrene between different areas in the same season ($P < 0.05$) and among different seasons in the same area ($P < 0.05$). The contents of the children urine neurotransmitters (Glu, GABA, DA and 5-HT) increased with the increase of age in the same area, and decreased with the increase of the concentration of air benzo(a)pyrene in children of the same age. **Conclusion** Exposure to air benzo(a)pyrene can decrease the urine neurotransmitters in 3-5 years old children, and the detailed reasons and mechanism need further research.

[Key words] benzo(a)pyrene; urine; neurotransmitter; child

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(5): 548-551]

苯并[a]芘(B[a]P)是多环芳烃类化学污染物的一种代表性物质, 主要来源于燃煤、燃气、炼焦、炼油、高分子化合物合成、垃圾焚烧等, 广泛分布在空

气、土壤和水中^[1]。由于 B[a]P 及其代谢产物的强致癌性^[2], 已被美国 EPA 确立为优先控制的 16 种多环芳烃类污染物。国内外的研究表明 B[a]P 具有

[收稿日期] 2015-10-21 **[接受日期]** 2016-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81372957)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81372957)。

[作者简介] 罗 珑, 硕士生, E-mail: luolong19890326@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485008, E-mail: tubaijie@163.com

肯定的神经毒性和发育神经毒性^[3-4]。然而关于B[a]P暴露对儿童行为发育的影响及其机制研究少见报道,我国作为多环芳烃物质污染超级大国并没有做过相关的系统研究;加之儿童的神经系统尚未发育成熟,对神经毒物的敏感性要高于成年人,而神经系统发育毒性作用又具有迟发性、潜隐性、涉及多个系统、可与其他有害因素发生协同作用等特点,因此研究此类物质对儿童行为发育的影响及其机制意义重大。

本课题组在先前的动物实验中发现B[a]P染毒组谷氨酸(Glu)和 γ -氨基丁酸(GABA)等学习记忆相关神经递质基因表达较对照组有显著变化^[5];随后发现B[a]P染毒组仔鼠具有肯定的神经行为发育毒性,海马区Glu和GABA表达较对照组明显减少^[6],提示B[a]P暴露影响神经递质的含量。神经递质在儿童学习与记忆、行为和智力发育中发挥关键性作用^[7],因此本研究针对B[a]P污染相关区域学龄前(3~5岁)儿童,检测其尿液神经递质水平,探讨此类污染物对儿童尿液神经递质的影响,为B[a]P神经发育毒性的防治工作提供科学依据。

1 对象和方法

1.1 空气中B[a]P含量测定

以位于重庆市九龙坡区与大渡口区交界处的重庆钢铁集团焦化厂作为污染源,分别选取焦化厂周围(距离1 000 m)、杨家坪商业区(距离2 000 m)、大坪交通区(距离3 000 m)和袁家岗生活区(距离4 000 m)4个区域进行空气中B[a]P含量测定。采样时间为2014年9月到2015年8月。对上述每个采样区域选取3个小区,每个小区设置2个采样点,距地面1.2 m高度处采样;每天用B[a]P采样器连续采样4 h,每个月采样3 d,分上、中、下旬进行;采样时考虑风向、晴雨等气候条件对采样的影响。参照卢涛等^[8]的研究方法采用高效液相色谱法检测空气中B[a]P浓度。依据监测区域所监测小区空气中B[a]P暴露浓度大小将研

究区域分成对照、低暴露、中暴露、高暴露4个等级。

1.2 研究对象

选取出生于上述4个区域且出生以来居住地固定的3~5岁学龄前儿童作为研究对象,排除其他原因引起的神经系统疾病患儿。将对应小区中符合条件的儿童根据测定研究区域的B[a]P暴露等级分别作为对照与低、中、高暴露组人群。本次调查时间为2015年3月末。一共纳入了符合研究对象条件的儿童216人,每组人群(54人)分别来自所选区域进行空气B[a]P监测的3个小区,每个小区18人,每一年龄组6人。各组男女性别比例为高暴露组29:25,中暴露组28:26,低暴露组27:27,对照组29:25。本次调查经学校伦理委员会审核通过,所有研究对象的家长均知情同意。

1.3 尿液神经递质含量测定

采用一次性尿杯收集目标儿童晨尿中段尿,倒入5 mL EP管内并贴上标签,收集完后立即送回实验室-20℃保存。采用ELISA法测定儿童尿液神经递质Glu、GABA、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)含量。

1.4 统计学处理

所有数据用SPSS 20.0统计软件包分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用单因素方差分析,用LSD法进行两两比较。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 空气中B[a]P含量测定结果

空气中的B[a]P暴露浓度如表1所示。随着与污染源距离变大,同一季度不同区域B[a]P浓度逐渐降低,4组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。同一区域不同季度整体比较差异也有统计学意义($P < 0.05$),并且在第1、第4季度B[a]P浓度明显高于第2、第3季度。依据B[a]P浓度,将焦化厂周围(1 000 m)定为高暴露组,杨家坪商业区(2 000 m)为中暴露组,大坪交通区(3 000 m)为低暴露组,袁家岗生活区(4 000 m)为对照组。

表1 不同区域、不同季度空气中苯并[a]芘浓度

Tab 1 Concentration of air benzo(a)pyrene in different areas and in different seasons

Sampling area	$\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}), n=54, \bar{x} \pm s$				<i>P</i>
	The 1 st quarter	The 2 nd quarter	The 3 rd quarter	The 4 th quarter	
Near the coking plant (1 000 m)	0.126±0.008	0.096±0.008	0.084±0.006	0.116±0.010	<0.05
The business district (2 000 m)	0.071±0.002	0.062±0.003	0.054±0.003	0.072±0.002	<0.05
The traffic areas (3 000 m)	0.062±0.004	0.054±0.003	0.047±0.004	0.056±0.006	<0.05
The living areas (4 000 m)	0.008±0.002	0.007±0.003	0.006±0.003	0.008±0.003	<0.05
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

2.2 尿液神经递质检测结果 一共检测 216 份尿液样本,高、中、低暴露和对照组各 54 份,每组含不同年龄段(3 岁、4 岁、5 岁)样本各 18 份;每份尿液样本分别检测 4 种神经递质(Glu、GABA、DA、

5-HT)的含量,结果见表 2。在同一 B[a]P 暴露水平下,4 种神经递质水平均随着年龄的增大逐渐升高;在同一年龄段,4 种神经递质水平均随着 B[a]P 暴露水平的升高而逐渐降低($P < 0.05$)。

表 2 不同苯并[a]芘暴露水平下儿童尿液 4 种神经递质含量变化

Tab 2 Contents of urine neurotransmitter of children exposed to different concentrations of air benzo(a)pyrene

$n=18, \bar{x} \pm s$

Neurotransmitter	Age (year)	High exposure	Middle exposure	Low exposure	Control	P
Glu $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	3	0.262±0.037**	0.288±0.040	0.298±0.036	0.302±0.047	0.019
	4	0.273±0.051**	0.299±0.034	0.317±0.032	0.320±0.051	0.007
	5	0.293±0.053**	0.314±0.046	0.331±0.047	0.321±0.050	0.015
GABA $\rho_B/(pg \cdot mL^{-1})$	3	249.82±41.69**	269.77±23.21	284.63±43.39	290.98±52.77	0.021
	4	308.94±49.68**	327.03±28.18	344.98±31.65	352.71±53.63	0.013
	5	350.05±46.14**	369.83±30.42*	381.76±15.73	394.13±39.31	0.003
DA $\rho_B/(pg \cdot mL^{-1})$	3	211.11±28.16**	226.20±19.04**	244.21±32.83	259.13±56.78	0.001
	4	236.13±38.73**	244.12±33.36*	362.77±31.21	275.71±51.06	0.015
	5	264.27±36.61**	280.39±26.79**	304.02±30.00	314.20±44.94	<0.001
5-HT $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$	3	8.59±0.46**	8.84±0.37	8.93±0.51	9.09±0.60	0.027
	4	9.19±0.57**	9.51±0.75	9.62±0.62	9.91±0.78	0.023
	5	9.72±0.61**	9.92±0.36	10.15±0.40	10.26±0.55	0.014

Glu: Glutamate; GABA: γ -aminobutyric acid; DA: Dopamine; 5-HT: 5-hydroxytryptamine. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

焦化厂企业生产可产生大量的 B[a]P 等多环芳烃类化学物质,此类物质日积月累,可对周围儿童健康产生不利影响。Choi 等^[9]研究发现孕期 B[a]P 接触能够导致后代低出生体质量、低头围及神经行为损害,同时伴随认知和神经运动等功能的降低;Perera 等^[10]的队列研究发现产前接触多环芳烃类物质与出生后儿童注意力不集中、多动症和行为发育异常有关。上述研究主要针对孕期暴露对后代的发育结果影响,目前还未见出生后儿童 B[a]P 暴露对儿童行为发育改变及神经递质改变的相关报道,对 B[a]P 所致的儿童发育神经毒性及其机制还需要大量研究。

重庆市主城区上空由于受地形的影响,除夏季以偏南风为主以外,其余季节主要以偏东风为主,并且风速较小、以静风为主。重庆主城周边区作为老工业基地,工业污染比较严重。此次调查发现,随着与污染源距离的增大,空气 B[a]P 的含量逐渐降低,而同一区域内第 1、第 4 季度高于第 2、第 3 季

度。与卢涛等^[8]在 2008 年对以上 4 个区域的监测结果比较,各区域空气中 B[a]P 含量略微降低。收集 3~5 岁儿童晨尿样本用 ELISA 法检测发现,在同一年龄段,Glu、GABA、DA、5-HT 的含量随着 B[a]P 浓度的升高而降低;在同一 B[a]P 暴露水平下,随着年龄的增大,上述 4 种神经递质含量逐渐升高。Grova 等^[11]和 Brown 等^[12]检测了谷氨酸受体和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体相关基因的表达,发现这两个受体的基因表达异常与 B[a]P 染毒诱导的短期学习与记忆功能障碍有关。本课题组在先前的动物实验中发现 B[a]P 暴露组与对照组比较大鼠海马区域 Glu、GABA 的含量降低,电镜下观察发现与这两种神经递质的释放障碍有关^[6]。本次调查针对特定人群也发现高 B[a]P 暴露组与对照组比较 4 种神经递质的减少差异有统计学意义,提示 B[a]P 暴露影响学龄前儿童尿液的神经递质含量,其神经毒性机制可能与影响其神经递质相关受体基因表达进而影响神经递质含量变化有关。

神经递质是一类主要由神经系统分泌、释放,广泛存在于机体各部位并发挥着重要作用的信号分

子,神经递质常作为生物标记物间接反映中枢神经系统的功能活动和疾病状态^[13]。尿液神经递质检查由于其无创性、样本易于获得、稳定性和灵敏性^[14],已经越来越受科研人员和神经科医生的青睐。ELISA已广泛应用于科研和临床,在检测儿童尿液神经递质方面已被证实具有很好的灵敏度和特异度并且可实现快速检测^[15-16]。本研究发现儿童尿液的神经递质可以作为反映B[a]P接触所致神经毒性标记物,但儿童尿液的神经递质由于其分泌的复杂性和影响因素的多样性,并不一定能很好地代表中枢系统神经递质水平,因此还需要与儿童行为评估结果相结合进一步分析。

本研究仅探讨了空气中B[a]P暴露水平与儿童尿液神经递质改变的关系,还需进一步检测内暴露水平尿1-羟基芘含量并分析其与儿童尿液神经递质含量的关系。此外,环境中的污染物往往具有协同和联合作用的特点,在本次调查中并不能完全排除其他污染物对结果的影响,也没有调查儿童行为的发育情况,在未来研究中有必要纳入多种污染物进行多因素分析,并结合儿童行为发育结果分析尿液神经递质改变,得出更加科学、合理的结论。

[参考文献]

[1] 段小丽,魏复盛. 苯并(a)芘的环境污染、健康危害及研究热点问题[J]. 世界科技研究与发展,2002,24:11-17.

[2] 张丽娟,李 觉. 反式二羟环氧苯并芘诱导人支气管上皮细胞 p53 表达分析[J]. 第二军医大学学报,2009,30:1322-1324.
ZHANG L J, LI J. Anti-benzo(a) pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced expression of p53 in human bronchial epithelial cells[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30: 1322-1324.

[3] Perera F P, Tang D, Wang S, Vishnevetsky J, Zhang B, Diaz D, et al. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years[J]. Environ Health Perspect, 2012, 120: 921-926.

[4] Niu Q, Zhang H, Li X, Li M. Benzo[a] pyrene-induced neurobehavioral function and neurotransmitter alterations in coke oven workers[J]. Occup Environ Med, 2010, 67: 444-448.

[5] Qiu C, Cheng S, Xia Y, Peng B, Tang Q, Tu B. Effects of subchronic benzo(a) pyrene exposure on neurotransmitter receptor gene expression in the rat hippocampus related with spatial learning and memory change[J]. Toxicology, 2011, 289(2/3): 83-90.

[6] 段 利. 苯并[a]芘诱导新生幼鼠 Glu 和 GABA 神经递质释放及传导障碍的机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2014.

[7] Eichenbaum H. How does the brain organize memories? [J]. Science, 1997, 277: 330-332.

[8] 卢 涛,汤 艳,涂白杰. 重庆市九龙坡区某焦化厂苯并[a]芘污染状况调查分析[J]. 环境与健康杂志,2010,27:248-250.

[9] Choi H, Jedrychowski W, Spengler J, Camann D E, Whyatt R M, Rauh V, et al. International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth[J]. Environ Health Perspect, 2006, 114: 1744-1750.

[10] Perera F P, Chang H W, Tang D, Roen E L, Herbstman J, Margolis A, et al. Early-life exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and ADHD behavior problems[J]. PLoS One, 2014, 9: e111670.

[11] Grova N, Valley A, Turner J D, Morel A, Muller C P, Schroeder H. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a) pyrene [J]. Neurotoxicology, 2007, 28: 630-636.

[12] Brown L A, Khoubouei H, Goodwin J S, Irvin-Wilson C V, Ramesh A, Sheng L, 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: 965-978.

[13] 张琰敏,马 蓓,高文元. 噪声性听损失与耳蜗内神经递质改变的研究进展[J]. 第二军医大学学报,2007,28:430-433.
ZHANG Y M, MA B, GAO W Y. Noise-induced hearing loss and cochlea neurotransmitters: recent progress[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28: 430-433.

[14] Marc D T, Ailts J W, Campeau D C, Bull M J, Olson K L. Neurotransmitters excreted in the urine as biomarkers of nervous system activity: validity and clinical applicability[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2011, 35: 635-644.

[15] Nichkova M I, Huisman H, Wynveen P M, Marc D T, Olson K L, Kellermann G H. Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402: 1593-1600.

[16] Nichkova M, Wynveen P M, Marc D T, Huisman H, Kellermann G H. Validation of an ELISA for urinary dopamine: applications in monitoring treatment of dopamine-related disorders[J]. J Neurochem, 2013, 125: 724-735.