

孕期尼古丁暴露对子代大鼠脑组织单胺类神经递质水平的影响

聂琛¹, 关怀², 李秋娟³, 李双月³, 张艳³, 冯丽娜³, 郝捷³, 袁利刚⁴

摘要: [目的] 探讨孕期尼古丁暴露对子代大鼠脑组织单胺类神经递质水平的影响。[方法] 24只SD受孕大鼠, 随机分为4组, 即对照组和1.0、2.0、4.0 mg/kg染毒组, 每组6只。孕7天起, 对照组孕鼠皮下注射生理盐水1 mL, 染毒组孕鼠皮下注射尼古丁生理盐水溶液1 mL(各染毒组按1.0、2.0、4.0 mg/kg计算尼古丁量), 1次/d, 直至分娩。测定5周龄子鼠体重、脑重, 计算脑脏器系数; 测定5周龄子鼠大脑皮质和海马中去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和5羟色胺(5-HT)的质量分数(后简称“含量”)。[结果] 4.0 mg/kg染毒组子鼠脑重和脑脏器系数低于另3组($P<0.05$)。3个染毒组子鼠大脑皮层NE、DA和5-HT含量均低于对照组($P<0.05$); 4.0 mg/kg染毒组子鼠NE含量低于另2个染毒组($P<0.05$), 2.0、4.0 mg/kg染毒组子鼠DA含量低于1.0 mg/kg染毒组($P<0.05$), 4.0 mg/kg染毒组子鼠5-HT含量低于1.0 mg/kg染毒组($P<0.05$)。3个染毒组子鼠海马NE和DA含量均低于对照组($P<0.05$); 海马DA含量与染毒剂量间呈剂量-效应关系($P<0.05$), 4.0 mg/kg染毒组子鼠海马5-HT含量低于对照组($P<0.05$)。[结论] 孕期尼古丁暴露影响子代大脑皮层和海马单胺类神经递质含量, 可能参与其导致的神经发育毒性过程。

关键词: 尼古丁; 孕期; 子代; 去甲肾上腺素; 多巴胺; 5羟色胺

Effects of Gestational Exposure to Nicotine on Levels of Monoamine Neurotransmitters in Brain Tissues of Rat Offspring NIE Chen¹, GUAN Huai², LI Qiu-juan³, LI Shuang-yue³, ZHANG Yan³, FENG Li-na³, HAO Jie³, YUAN Li-gang⁴ (1.Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116031, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, No. 210 Hospital of PLA, Dalian, Liaoning 116021, China; 3.Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China; 4.Department of Anesthesiology, Liaohe Oilfield General Hospital, Panjin, Liaoning 124010, China) · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To evaluate the effects of gestational exposure to nicotine on the levels of monoamine neurotransmitters in various brain regions of rat offspring. [Methods] Twenty-four pregnant SD rats were randomly divided into four groups and treated with nicotine saline at dose of 0.0, 1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg daily through subcutaneous injection starting from the seventh gestational day until delivery. At the age of 5 weeks, the body and brain weights of offspring were measured, brain organ coefficient was calculated, and the levels of norepinephrine (NE), dopamine (DA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in cerebral cortex and hippocampus of offspring were detected. [Results] The brain weight and brain organ coefficient of the 4.0 mg/kg nicotine treatment group were significantly lower than those of the other three groups ($P<0.05$). In offspring cerebral cortex, the levels of NE, DA, and 5-HT of the three nicotine exposed groups were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$); the level of NE of the 4.0 mg/kg nicotine treatment group was significantly lower than those of the other two nicotine exposed groups ($P<0.05$); the levels of DA of the 2.0 mg/kg and 4.0 mg/kg nicotine exposed groups were significantly lower than that of the 1.0 mg/kg nicotine exposed group ($P<0.05$); the level of 5-HT of the 4.0 mg/kg nicotine exposed group was significantly lower than that of the 1.0 mg/kg nicotine exposed group ($P<0.05$). In offspring hippocampus, the levels of NE and DA of the three nicotine exposed groups were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$); a dose-effect relationship was found between the DA level and the dose of nicotine treatment ($P<0.05$); the level of 5-HT in the 4.0 mg/kg nicotine exposed group was significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). [Conclusion] Gestational exposure to nicotine could influence the levels of monoamine neurotransmitters in the cerebral cortex and hippocampus of rat offspring, which might participate the neurodevelopmental toxicity induced by nicotine.

Key Words: nicotine; gestation; offspring; norepinephrine; dopamine; 5-hydroxytryptamine

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15364

[作者简介] 聂琛(1982—), 女, 硕士, 主治医师; 研究方向: 神经毒理学; E-mail: niechen216789@126.com

[作者单位] 1. 大连医科大学附属第二医院神经内科, 辽宁 大连 116031; 2. 解放军第210医院妇产科, 辽宁 大连 116021; 3. 大连医科大学劳动卫生与环境卫生教研室, 辽宁 大连 116044; 4. 盘锦市辽河油田总医院麻醉科, 辽宁 盘锦 124010

孕期吸烟和被动吸烟具有神经发育毒性,近年来引起国内外学者广泛关注^[1]。这种毒作用主要由其中的尼古丁成分引起^[2]。尼古丁,又称烟碱,是烟草中的主要有机毒物。尼古丁可通过胎盘进入胎儿血循环,再经过不成熟的血脑屏障,攻击发育中的脑组织^[2]。动物实验表明,孕期尼古丁暴露可引起剂量相关的神经发育迟缓和认知功能障碍^[1]。然而,其神经毒作用机制至今不清。已证实,单胺类神经递质可介导突触间的神经化学传递,从而对注意力、记忆力和反应能力等具有重要调节作用。多种环境污染物对智力发育的损伤均与改变神经递质含量有关^[3-6]。实验动物证实,尼古丁染毒可致幼年或成年大鼠脑内神经递质含量改变,并出现神经行为异常^[7-9]。孕期尼古丁暴露是否引起学习关键脑区大脑皮层和海马组织单胺类神经递质含量改变,鲜见报道。本研究组的前期实验结果表明,采用1.0、2.0、4.0 mg/kg剂量对孕大鼠进行孕中、晚期皮下注射尼古丁染毒,能够建立子鼠出生后早期神经行为发育迟缓及成年早期学习、记忆能力低下的模型^[10]。本研究在此模型基础上,测定子鼠成年早期(出生后5周)大脑皮层和海马组织单胺类神经递质去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)和五羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量,为阐明尼古丁的神经发育毒作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体级(SPF)9周龄SD孕大鼠24只,由大连医科大学动物中心提供[许可证号:SCXK(辽)2008-0002,20130715],体重为193~215 g。饲养环境温度20~25℃,湿度50%~60%,自然节律采光,标准饲料,自由进食、水。

1.2 主要试剂和仪器

尼古丁(纯度>99%,北京伊普瑞斯科技有限公司),NE、DA和5-HT测定试剂盒(Sigma,美国),色谱级甲醇(国药集团化学试剂有限公司,中国),乙酸钠(上海化学试剂有限公司,中国),高氯酸(天津市鑫源化工有限公司,中国),高效液相色谱(1525)-荧光检测器(Waters 474)(Waters公司,美国),HC-2518R高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司,中国)。

1.3 分组与处理

将24只孕鼠随机分为4组,分别为对照组和1.0、

2.0、4.0 mg/kg尼古丁染毒组,每组6只。孕7天起,对照组孕鼠皮下注射生理盐水1 mL,染毒组孕鼠皮下注射尼古丁生理盐水溶液1 mL(各染毒组按1.0、2.0、4.0 mg/kg计算尼古丁量),1次/d,直至分娩。各组孕鼠自然分娩,自由哺乳。子鼠出生3天时调整每窝子鼠数为8~10只,雌:雄比例为4:6或5:5或6:4,以保证各窝子鼠数均衡。出生后23天断乳,子鼠按性别及组别重新分笼,每笼4~5只,自由进食、水。

1.4 指标与方法

1.4.1 体、脑重和脑脏器系数 5周龄时,每组取子鼠6只,雌雄各半,称重后拉颈处死。迅速分离脑组织,生理盐水冲洗,滤纸拭干,天平称重,计算脑脏器系数。

1.4.2 单胺类神经递质 上述实验用鼠分离脑组织后继续显微分离大脑皮层和海马(冰上操作),-80℃冻存。测定时,取冰冻组织称重,加入0.1 g/mL预冷高氯酸溶液,冰上匀浆,离心,取20 μL上清液。按照张璇等^[3]报道的高效液相色谱-荧光检测法测定NE、DA和5-HT的质量分数(后简称“含量”)。

1.5 统计学分析

数据分析采用SPSS 17.0软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述分布,多组间均值比较采用单因素方差分析,两组间均值比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 体重、脑重及脑脏器系数

4组子鼠脑重和脑脏器系数比较,存在明显差异($P<0.05$)。其中,4.0 mg/kg染毒组子鼠脑重和脑脏器系数低于对照组和1.0、2.0 mg/kg染毒组($P<0.05$)。4组子鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 孕期尼古丁暴露后子鼠体重、脑重及脑脏器系数比较

染毒剂量(mg/kg)组	体重(g)	脑重(g)	脏器系数(%)
0(对照组)	103.54 ± 10.02	1.70 ± 0.11	1.64 ± 0.12
1.0	102.23 ± 9.78	1.71 ± 0.13	1.67 ± 0.11
2.0	101.43 ± 13.11	1.62 ± 0.10	1.60 ± 0.14
4.0	98.53 ± 8.20	1.46 ± 0.11 ^{abc}	1.48 ± 0.08 ^{abc}
F	0.257	5.990	3.359
P	0.856	0.004	0.039

[注]a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与1.0 mg/kg染毒组比较, $P<0.05$;c:与2.0 mg/kg染毒组比较, $P<0.05$ 。

2.2 单胺类神经递质含量

2.2.1 子鼠大脑皮层NE、DA和5-HT含量 3个染毒组子鼠大脑皮层NE、DA和5-HT含量均低于对照组

($P<0.05$); 4.0 mg/kg 染毒组子鼠 NE 含量低于 1.0 和 2.0 mg/kg 染毒组 ($P<0.05$), 2.0 和 4.0 mg/kg 染毒组子鼠 DA 含量低于 1.0 mg/kg 染毒组 ($P<0.05$), 4.0 mg/kg 染毒组子鼠 5-HT 含量低于 1.0 mg/kg 染毒组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.2.2 子鼠海马 NE、DA 和 5-HT 的含量 3 个染毒组子鼠海马 NE 和 DA 的含量均低于对照组 ($P<0.05$); 海马 DA 含量与染毒剂量间呈剂量-效应关系 ($P<0.05$), 4.0 mg/kg 染毒组子鼠海马 5-HT 含量低于对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 孕期尼古丁暴露后子鼠不同部位单胺类神经递质含量 ($\bar{x} \pm s$, ng/g)

染毒剂量 (mg/kg) 组	大脑皮层			海马		
	NE	DA	5-HT	NE	DA	5-HT
0(对照组)	322.03 ± 43.34	722.97 ± 37.24	424.99 ± 33.40	360.24 ± 86.11	642.22 ± 47.21	274.01 ± 38.20
1.0	240.33 ± 31.17 ^a	618.22 ± 45.91 ^a	345.79 ± 37.34 ^a	311.65 ± 64.92 ^a	532.68 ± 54.25 ^a	248.86 ± 26.27
2.0	234.62 ± 30.50 ^a	545.01 ± 52.16 ^{ab}	313.41 ± 42.43 ^a	297.34 ± 66.77 ^a	466.41 ± 63.36 ^{ab}	252.65 ± 28.31
4.0	220.10 ± 22.49 ^{abc}	514.62 ± 63.67 ^{ab}	283.01 ± 47.25 ^{ab}	286.67 ± 57.41 ^a	401.26 ± 34.51 ^{abc}	231.92 ± 35.34 ^a
<i>F</i>	10.910	23.293	15.409	3.401	21.165	3.764
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.047	0.000	0.041

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与 1.0 mg/kg 染毒组比较, $P<0.05$; c: 与 2.0 mg/kg 染毒组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

在欧美国家, 孕妇吸烟比较常见。在我国, 孕妇多能有意识地避免主动吸烟, 但被动吸烟常不可避免。据统计, 我国被动吸烟人群高达 7.4 亿, 妇女、儿童是最大受害者^[11], 因此, 孕期被动吸烟形势十分严峻。烟草含多种有害物质, 其中对胎儿影响较大的为尼古丁和镉, 而神经发育毒性主要由尼古丁引起。哺乳动物的快速脑发育期为孕中、晚期和出生后早期, 此期神经元处于快速生长和分化阶段, 血脑屏障不完善, 加之机体对毒物的清除能力差, 一旦受到毒物攻击, 可影响神经发育, 甚至造成永久性损害^[12]。流行病学资料表明, 孕期吸烟和被动吸烟可致子代智力下降; 动物实验表明, 孕期尼古丁暴露可致子代出生后远期认知功能异常^[1]。本研究组在前期实验中采用 1.0、2.0、4.0 mg/kg 剂量对孕大鼠进行孕中、晚期皮下注射尼古丁染毒, 经断崖回避、平面翻正、前肢悬挂、听觉惊愕等测试, 观察到子鼠在出生后早期表现出不同程度的神经行为功能异常; 经步下实验和水迷宫实验, 观察到子鼠在成年早期表现出条件依赖性和空间依赖性学习、记忆能力下降^[10]。提示, 此剂量尼古丁孕期染毒致子代神经发育损伤模型成立。

本研究在前述实验基础上, 进一步探讨孕期尼古丁暴露致子代神经发育毒作用机制。结果表明, 4.0 mg/kg 尼古丁染毒组子鼠成年早期脑重和脑脏器系数均低于另 3 组, 提示孕期较高剂量尼古丁暴露可对子代出生后远期脑形态造成明显影响。神经递质是神经元信号传递的物质基础。单胺类神经递质参与许多神经生理过程。痴呆患者常伴有此类神经递质明显减

少^[13], 环境毒物如砷、氟、酒精、六溴环十二烷等引起的学习、记忆障碍均被证实与干扰单胺类神经递质释放有关^[3-6], 提示其与认知功能密切相关。单胺类神经递质分布于哺乳动物的多个脑区, 以其在学习关键脑区大脑皮层和海马的分布对认知发育影响最大。本研究结果提示, 孕期尼古丁染毒导致子鼠成年早期大脑皮层和海马 3 种主要的单胺类神经递质 NE、DA 和 5-HT 含量出现不同程度降低, 提示尼古丁的神经发育毒性可能与影响单胺类神经递质释放有关。进一步分析显示, 大脑皮层似乎对尼古丁毒性更加敏感, 低剂量染毒即引起 3 种递质明显减少, 呈剂量-反应关系。因大脑皮层司管感觉、运动、学习等多种功能^[14], 这些神经递质含量下降也可能引起多种功能异常, 与我们前期实验中孕期尼古丁染毒导致子鼠出生后早期系列神经反射功能障碍表现一致。海马组织 DA 含量受到的影响较大, 呈现剂量-反应关系; 而 NE 和 5-HT 则受到不同程度的较轻影响, 提示尼古丁影响海马功能的分子机制可能更加复杂。总之, 本研究观察到孕期尼古丁染毒影响子代大鼠脑组织单胺类神经递质含量, 提示其可能与尼古丁神经毒作用机制有关。但尼古丁如何引起这些递质释放改变, 尚需更多、更深入的研究阐明。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

[1] Sepehri G, Parsania S, Hajzadeh MA, et al. The effects of co-administration of opium and morphine with nicotine during pregnancy on spatial learning and memory of adult male offspring rats [J]. Iran J Basic Med Sci, 2014, 17(9): 694-701.

- [2] Gold AB, Keller AB, Perry DC. Prenatal exposure of rats to nicotine causes persistent alterations of nicotinic cholinergic receptors[J]. Brain Res, 2009, 1250: 88-100.
- [3] 张璇, 朴丰源, 刘鹏. 砷对小鼠脑单胺类神经递质浓度影响及牛磺酸、维生素C的保护作用[J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(2): 102-106.
- [4] 朱玉龙, 郑玉建, 吕小敏, 等. 氟对大鼠水迷宫学习记忆及脑内单胺类神经递质浓度的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(3): 331-333.
- [5] 毛健, 苏旸, 陈薛钗, 等. 酒精处理后鼠脑内单胺氧化酶活性及单胺神经递质代谢变化的测定[J]. 化学通报, 2010, 8: 761-764.
- [6] 刘芳, 冀秀玲, 赵文娟, 等. 六溴环十二烷对发育期大鼠脑单胺类神经递质质量比及单胺氧化酶活性的影响[J]. 安全与环境学报, 2012, 12(2): 6-9.
- [7] Kirch DG, Gerhardt GA, Shelton RC, et al. Effect of chronic nicotine administration on monoamine and monoamine metabolite concentrations in rat brain[J]. Clin Neuropharmacol, 1987, 10(4): 376-383.
- [8] Lee EH. Effects of nicotine on exploratory behavior in rats: correlation with regional brain monoamine levels[J]. Behav Brain Res, 1985, 17(1): 59-66.
- [9] Shearman E, Fallon S, Sershen H, et al. Nicotine-induced monoamine neurotransmitter changes in the brain of young rats[J]. Brain Res Bull, 2008, 76(6): 626-639.
- [10] 冯和玺, 关怀, 梅俊杰, 等. 妊娠期大鼠皮下注射尼古丁对子代发育和行为的影响[J]. 环境与职业医学, 2015, 32(1): 11-15.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 中国吸烟危害健康报告[R]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012: 19-20.
- [12] Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(3): 330-338.
- [13] 李生菊. 老年性痴呆患者单胺类神经递质水平及与记忆力的关系[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(5): 1374-1375.
- [14] 杨天亮, 辛斐, 雷旭. 人类大脑结构和功能的性别差异: 来自脑成像研究的证据[J]. 心理科学进展, 2015, 23(4): 571-581.

(收稿日期: 2015-05-29)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶、王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)

(上接第52页)

要按照《职业病防治法》的要求, 尽快制订职业病防治标准, 以政府法规形式, 要求企业强制执行; 建立职业病防治监测举报网络, 及时发现并查处违法行为; 应建立健全监管部门和用人单位的责任追究制度, 督促用人单位及时组织职工健康检查, 做到职业病的早发现、早诊断、早治疗, 切实保障劳动者健康权益、确保经济社会的和谐发展^[7]。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 林莉, 宁琼, 贺今, 等. 济南市2002—2011年职业病发病情况分析[J]. 中国工业医学杂志, 2012, 25(5): 373-375.
- [2] 郭长轩, 蒋文中, 丁新平, 等. 淮北矿区煤矿尘肺病发病及现状的调查[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(1): 20-22.
- [3] 林秋红, 刘移民, 郭静宜. 广州市2001—2010年职业病发病情况分析[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(10): 759-762.
- [4] 肖云龙, 蒋然子, 刘敏, 等. 湖南省56546例尘肺病例接尘工龄分析[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2010, 28(11): 838-839.
- [5] 程金霞, 蔡翔, 杨小平, 等. 扬州市10年间职业病发病状况分析[J]. 现代预防医学, 2007, 34(6): 1082-1083.
- [6] 胡晓雷, 傅正义, 阴旅宁, 等. 568例煤工尘肺职业病诊断资料分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(15): 2832-2834.
- [7] 张继荣. 合肥市1974—2006年职业病报告及劳动者个人防护用品使用情况分析[J]. 现代预防医学, 2008, 35(12): 2223-2225.

(收稿日期: 2015-03-09)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶、丁瑾瑜; 校对: 葛宏妍)