论著

文章编号:1000-5404(2009)09-0788-03

化学染毒及高温环境对孕鼠子代海马神经元形态及神经行为的影响

张 红,赵聪敏,张雨平,王文益 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨化学毒物及高温环境对孕鼠子代海马神经元的形态和神经行为的影响。**方法** 将孕鼠随机分为对照组、染毒组、染毒联合高温组(联合组)和高温组,分别在孕早期(D1-D10)给予相应的处理。在生后不同时间观察新生大鼠大脑的发育以及海马神经元的形态变化,并检测新生大鼠的早期反射活动。**结果** 各组新生大鼠脑组织无畸形,但染毒组和联合组海马CA1区变性坏死的神经元数量明显多于对照组和高温组($P<0.01$)。出生1个月后染毒组和联合组海马CA1区神经元的数量明显少于对照组和高温组($P<0.05$)。行为学检测发现染毒组、联合组、高温组早期反射出现的时间均明显长于对照组。**结论** 化学染毒可导致新生大鼠海马神经元的变性、坏死。染毒联合高温并不加重脑组织海马神经元的损害,但高温对动物的早期正常反射的出现却有明显的延迟作用。

关键词:化学染毒;高温;孕鼠;海马;神经元

中图法分类号:R122.2;R338.26;R715.3 **文献标识码**:A

Effects of chemical compounds exposure and hyperthermal environment to pregnant rats on hippocampus neuronal morphology and neurobehavioral development of offsprings

ZHANG Hong, ZHAO Cong-min, ZHANG Yu-ping, WANG Wen-yi (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the effects of chemical compounds exposure and hyperthermal environment to pregnant rats on the hippocampus neuronal morphology and neurobehavioral development of their offsprings. Methods Pregnant rats were divided into 4 groups randomly: the control group; chemical compounds exposure group, chemical compounds combined hyperthermal exposure group and hyperthermal group. The control group was living in normal condition; the chemical compounds exposure group in a cabin with benzene (20.26 ± 0.80) mg/m^3, toluene (39.66 ± 4.23) mg/m^3, dimethylbenzene (42.40 ± 2.85) mg/m^3, and formaldehyde (23.13 ± 1.30) mg/m^3; the hyperthermal group was kept in an atmosphere of 38.5 ℃; and the combined group was exposed to the chemical compounds and high temperature at the same time. All animals were treated respectively 2 h per day for 10 d since their pregnancy. Their offspring were lived in normal condition. The development of brain and changes of hippocampus neuronal morphology were observed just or 1 month after born. The primary reflex activity of new-born rats was also examined. Results There was no abnormality in the brain of new born rats from 4 groups. In the chemical compounds exposure and the combined exposure groups, the number of degeneration and necrosis neurons in CA1 region of hippocampus were significantly more than those in control and hyperthermal groups ($P<0.01$). A month after born, the number of CA1 neurons were lesser than those in control and hyperthermal groups ($P<0.01$). The time of early period reflex appearance in chemical compounds exposed group, chemical compounds combined hyperthermal exposed group and hyperthermal group were significantly longer than that in control group. Conclusion Chemical compounds exposure can induce the degeneration and necrosis of hippocampus neurons. Chemical compounds combined hyperthermal exposure does not aggravate the damage to hippocampus neurons, however hyperthermal environment prolongs the time of early normal period reflex appearance.

Key words: chemical compounds exposure ; hyperthemia; pregnant rat; hippocampus; neuron

基金项目:国家计生委科技攻关项目(2007B070)

Supported by the Scientific Tackling Program of Family Planning Committee of China (2007B070)

作者简介:张 红,女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑发育方面的研究,现在解放军第324医院儿科。电话:(023)68763073,E-mail:cbcqcn@163.com

通信作者:赵聪敏,电话:(023)68755602

收稿日期:2009-01-14;**修回日期**:2009-02-22

胚胎期脑发育对各种刺激极为敏感,许多不良环境的刺激均容易导致脑结构和功能的发育不良。随着生活水平的提高,房屋装修造成室内空气污染状况逐渐普遍,装修材料中释放的化学物质(主要是甲醛、苯系物)可引起包括神经系统在内的多系统损害,严重时具有致畸、致癌、致突变等危害[1]。同时随着全球气候变暖,高温在自然劳动环境中经常出现,怀孕早期的妇女经常暴露于高温、房屋装修污染或二者复合作用中[2]。但目前,大多数研究局限于单一的物理或化学毒物。本实验选择高温与化学染毒联合作用于怀孕大鼠早期胚胎发育,探讨两因素对新生大鼠神经系统发育的影响,为化学染毒与联合高温致发育脑的形态和功能异常提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　动物分组与处理

将健康的 3 月龄 SD 雌性大鼠,体质量 210 ~ 220 g,雄性大鼠体质量 225 ~ 275 g(第三军医大学大坪医院实验动物中心繁育提供),按 2∶1 比例于每晚 6∶00 合笼过夜,次日清晨检查雌鼠,以发现阴栓为妊娠依据,并定为怀孕 D1。然后将 22 只孕鼠分成 4 组:对照组 3 只、染毒组 6 只、高温组 6 只、联合组 7 只。分别放入 4 种模拟家装室内空气污染和室内高温环境中,对照组:将孕鼠放入染毒柜中 2 h,不放任何污染物;染毒组:染毒柜中含苯 6 μl、甲苯 0.01 ml、二甲苯 0.01 ml,甲醛 0.2 ml;联合组:染毒柜内温度保持在 38.5℃,柜中含苯 6 μl、甲苯 0.01 ml、二甲苯 0.01 ml,甲醛 0.2 ml;高温组:染毒柜内温度保持在 38.5 ℃,不放任何污染物。每天处理各 2 h,共 10 d(D1 – D10)。实验期间自由饮水进食。每天处理结束后,孕鼠放回正常生活环境。孕鼠 D22 – D23 相继产仔,各组产仔数分别为:对照组 27 只、染毒组 57 只、高温组 60 只、联合组 69 只。

静式染毒柜体积 200 L,毒物各化学成分的比例是根据家装检测主要污染物的浓度来配置。各化学成分的最终实测浓度为:苯(20.26 ± 0.80) mg/m^3,甲苯(39.66 ± 4.23) mg/m^3,二甲苯(42.40 ± 2.85) mg/m^3, 甲醛(23.13 ± 1.30) mg/m^3。

1.2　大体观察指标

待动物正常生产后,各组按随机数字表取 5 只新生大鼠的大脑,在体视显微镜下观察神经管、体节和头部形态发育的情况。

1.3　病理学检测及分析

各组分别随机取 5 只新生大鼠和生后 1 个月的大鼠(在清洁级环境中饲养)进行常规麻醉、固定和灌注后取大脑组织,制作石蜡切片,根据大鼠立体定位图谱选择海马区域组织进行连续切片,HE 染色,观察海马组织 CA1 区域所有神经元的形态和数量的变化。神经元计数是在放大 200 倍的光镜下,随机选取 5 个视野,计数胞体清晰、胞核完整的正常的神经元。细胞质皱缩,胞核深染,甚至胞核溶解的细胞被认为是变性坏死的神经元。

1.4　行为学检测[3]

出生后检测各组新生大鼠的负趋向性、表面翻正反射和空间翻正反射出现的时间。

1.4.1　负趋向性检测　　将仔鼠头向下置于 – 25°斜面,在 15 s 内其完成转头并向斜面上方运动即为达标。从出生后第 3 天龄起检测并记录达标天龄,直到全窝的仔鼠达标。

1.4.2　表面翻正反射　　将仔鼠仰卧于一表面稍粗糙的硬质平板上,并使之保持片刻。松手后其能在 3 s 内翻正呈俯卧位并连续 3 次成功即为达标。从出生后第 3 天龄起检测。

1.4.3　空间翻正反射　　地面放置一块海绵垫,在距海绵垫 45 cm 高处将仔鼠置于仰卧位,然后松手使其自然落下。仔鼠在连续 2 次下落过程中均能自行转体并呈现俯卧位落地(四肢着地)为达标。从出生后第 11 天龄起检测。

1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Origin75 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

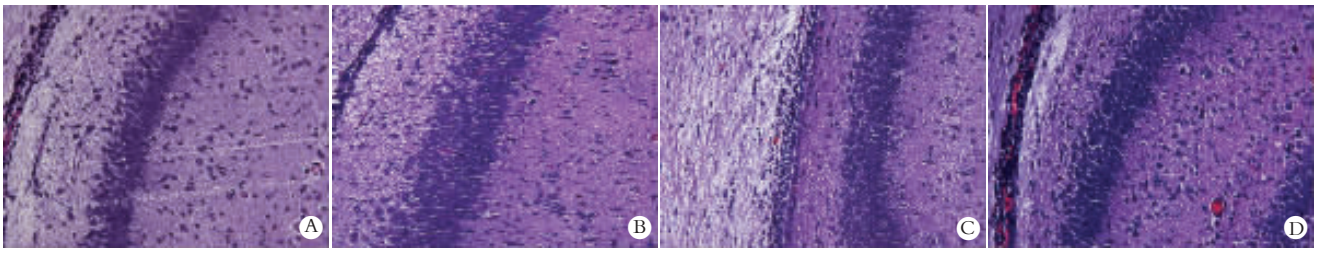
2.1　大体观察

各组新生大鼠的大脑组织形态正常,两半球结构清晰,沟回明显,在体视显微镜下未发现神经管未闭和体节段发育异常的动物。

2.2　病理染色结果

各组病理染色均可见核固缩的变性和坏死的神经元。其中刚出生时,染毒组和联合组海马 CA1 区变性坏死的神经元数量明显多于对照组和单纯高温组(表 1 和图 1,$P < 0.01$)。染毒组与联合组之间神经元变性坏死的数量无统计学差异。尽管高温组变性坏死的神经元数量多于对照组,但二者之间却无统计学差异。在出生 1 个月后,虽然变性坏死的神经元数量各组有些差异,但无统计学意义。

各组海马 CA1 区神经元的数量(个/高倍视野)统计结果发现:刚出生时各组神经元的数量无显著差异。但在出生 1 个月后染毒组和联合组的神经元的数量明显少于对照组和单纯高温组($P < 0.05$),但染毒组和联合组神经元数量无显著差异($P > 0.05$)。见表 2。



A:对照组;B:染毒组;C:联合组;D:高温组

图 1　各组新生大鼠海马组织病理学观察　(HE × 200)

表1 海马 CA1 区变性坏死神经元数量(个/高倍视野,$n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	出生时	生后1个月
对照组	4.50±1.29	2.75±0.50
染毒组	22.50±3.09[a]	5.25±0.50
联合组	21.75±6.70[a]	7.50±0.58
高温组	10.25±1.70[bc]	5.25±1.25

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与染毒组比较;c:$P<0.05$,与联合组比较

表2 海马 CA1 区神经元的数量(个/高倍视野,$n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	出生时	生后1个月
对照组	72.75±4.57	37.00±1.63
染毒组	68.00±2.94	23.25±1.71[a]
联合组	67.00±7.30	26.25±2.50[a]
高温组	70.00±7.50	38.50±2.89[bc]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与染毒组比较;c:$P<0.05$,与联合组比较

2.3 各种反射活动出现的时间

染毒组、联合组和高温组早期反射出现的时间均明显长于对照组($P<0.01$),而该3组之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

表3 各种反射活动出现的时间(t/d, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	负趋向性	表面翻正反射	空间翻正反射
对照组	7.67±0.58	5.33±0.57	10.67±0.58
染毒组	11.50±1.05[a]	8.17±0.75[a]	17.50±1.05[a]
联合组	12.14±1.35[a]	8.00±0.82[a]	17.57±0.98[a]
高温组	11.17±1.47[a]	8.50±0.55[a]	17.33±1.03[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

家装主要污染物甲醛和苯及其衍生物可作用于所有年龄组的人群。其对妊娠期妇女的影响除对母体本身产生危害外,还可能对体内的胎儿造成一定的危害[4,5]。近年来的国内外研究报道,宫内甲醛和苯类物质暴露对出生后小儿多个系统的生理功能均会产生影响[6,7]。随着全球气候的变暖,环境中的高温条件对人的影响也越来越受到人们的关注[8,9]。由于高温所引起的热应激也是一种具有生物意义的因子,它通过影响脑细胞的代谢以及神经细胞生理功能,从而对神经系统产生重要的影响[2,10,11]。但是就胚胎发育而言,一定程度的、机体可耐受的高温与家装低浓度污染联合作用是否对其神经系统的形态和功能产生影响,目前的研究较少。因此,本研究将孕早期的大鼠暴露于低浓度污染物和38.5 ℃的高温环境中,观察其对仔鼠大脑组织发育与神经行为能力的影响。结果表明:孕鼠无论是在低浓度污染物或38.5 ℃的环境,或是在二者共同作用下,都不会导致仔鼠大脑形态发育明显的畸形。在低污染物浓度下染毒,会引起新生仔鼠海马神经元的明显变性坏死,而且在成年后海马特定区域神经元的数量减少,这说明:低浓度的污染物很可能促进了发育过程中新生鼠海马神经元细胞的凋亡,从而在幼年后海马特定区域神经元的数量减少。同时孕期受到高温和毒物影响的孕鼠,其子代早期反射出现的时间明显延迟,而且高温与染毒均具有同样的行为学改变。根据目前的形态学结果分析:染毒联合高温并不加重脑组织海马神经元的损害,但高温情况下神经元变性、坏死以及凋亡的数量都比正常组有一定程度的增加,但不具有统计意义,而高温对动物的早期反射却有明显的延迟作用。因此,单纯高温环境对神经系统的结构及功能有无明确的影响及机制还有待进一步研究。研究结果提示,为避免对人胎儿神经发育发生潜在的不良影响,妊娠妇女应注意避免家装污染,特别是苯类物质和甲醛引起的室内空气污染,同时也尽量减少持续时间较长的高温环境暴露。

参考文献:

[1] 张全新,朱 伟,周 颖,等. 室内主要挥发性有机物对离体胚胎发育的影响[J]. 中国职业医学, 2007, 34(1): 24-28.

[2] 耿晓英,吴松笛,万 琪,等. 不同温度条件下体外培养小鼠皮质神经元形态及骨架蛋白的表达[J]. 中国临床康复,2006,10(29): 10-12.

[3] Jensh R P, Brent R L. The effects of prenatal X irradiation on the appearance of reflexes and physiologic markers in the neonatal rat[J]. Radiation Res, 1988, 116(3): 416-426.

[4] 杨巧媛,雷毅雄,黄福有. 新装修居室空气质量及居民健康状况调查[J]. 中国公共卫生,2008, 24(8): 985-986.

[5] 徐国锋,侯书芬,李凤苏. 装修所致室内空气污染状况调查[J]. 环境与职业医学,2008, 25(1): 76-78.

[6] 杨在明,袭著革,杨丹凤,等. 气态甲醛吸入染毒对小鼠水迷宫学习成绩及海马神经递质的影响[J]. 环境与健康杂志,2006,23(5): 402-404.

[7] Malek F A, Moritz K U, Fanghanel J. A study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats [J]. Ann Anat, 2003, 185(3): 277-285.

[8] Danno A, Fukuda W, Yoshida M, *et al*. Expression profiles and physiological roles of two types of prefoldins from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakaraensis[J]. J Mol Biol, 2008, 382(2): 298-311.

[9] 余 俐,徐如祥,姜晓丹,等. 高温高湿环境对犬脑组织的损害作用[J]. 中国临床康复,2004, 8(25): 5290-5291.

[10] Ren T F, Xing Z F, Feng H G, *et al*. Abnormal neural behaviors of neonatal rat due to hyperthermia and low dosage of cigarette exposure during pregnancy[J]. Chin J Clin Rehab, 2005, 9(16): 251-253.

[11] Yang Z X, Qin J, Du J B, *et al*. Febrile seizure, but not hyperthermia alone, induces the expression of heme oxygenase-1 in rat cortex [J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(3): 191-196.

(编辑 汪勤俭)