文章编号:1000-5404(2009)22-2181-05

论著

孕早期暴露家装空气污染物及高温对新生鼠神经行为的影响

张 红,赵聪敏 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨孕早期暴露家装空气污染物以及联合高温对新生大鼠神经行为的影响。**方法** 22只孕鼠随机分为4组,每天置于污染物柜、高温柜、高温联合污染物柜以及空染毒柜中2 h时,共10 d,然后对其分娩的新生鼠在不同时间点观察体质量变化和神经行为学改变。同时观察大鼠海马CA1区凋亡和死亡神经元的数量并检测海马组织中NMDA受体NR1亚基的基因表达变化。**结果** 化学污染物、高温可导致新生鼠海马神经元的死亡和凋亡以及促进海马NMDA受体NR1基因的表达,并对其神经行为、学习记忆能力有显著的影响,二者联合可加重其损伤作用。**结论** 孕早期暴露家装空气污染物和高温环境会对新生鼠神经系统的发育产生明显影响。

关键词:污染物;高温;孕鼠;神经行为
中图法分类号:R122;R715.3;R748 **文献标识码**:A

Effects of early pregnancy exposure to hazardous indoor air pollutants due to interior decoration and hyperthermia on neurobehavioral development of postnatal rats

ZHANG Hong, ZHAO Cong-min (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of early pregnancy exposure to hazardous indoor air pollutants due to interior decoration and hyperthermia on neurobehavioral development of postnatal rats. Methods Twenty-two pregnant rats were randomly divided into 4 groups. Each group was placed in pollutants cabinet, hyperthermia cabinet, hyperthermia + pollutants cabinet and empty cabinet respectively for 2 h per day for 10 d since their pregnancy. The weight and neurobehavioral development of postnatal rats were observed at different time points. The number of apoptotic and dead neurons in the CA1 region of hippocampus was observed in postnatal rats. The expression of the NR1 subunit of NMDA receptor of hippocampal neurons was also detected. Results Indoor pollutants and hyperthermia could accelerate apoptosis and necrosis of hippocampal neurons in CA1 region of postnatal rats and increase the expression of NR1 subunit of NMDA receptor. Furthermore, hazardous indoor pollutants and hyperthermia could induce remarkable influences on postnatal rats' neurobehavioral development, learning and memory capability. Indoor pollutants combined with hyperthermia aggravated these effects. Conclusion Exposure to environment of the hazardous indoor pollutants especially combined with hyperthermia during early pregnancy has remarkable influences on the nervous system of postnatal rats.

Key words: indoor pollutants; hyperthermia; pregnant rats; neurobehavior

孕早期暴露家装空气污染物对实验动物神经系统损害的研究多以动物出现神经系统畸形、出生缺陷作为观察指标。但神经系统在宫内即使受到有害因素影响,出生时表现出明显缺陷的也仅是少数,所以以出生缺陷作为衡量危险因素的指标会忽略很多的细微损害,并且发育早期微小损伤甚至只是几个细胞的损伤都会通过发育过程产生放大效应[1-3]。因此建立孕早期暴露家装空气污染物的孕鼠模型以及联合高温情况下的孕鼠模型,观察新生大鼠早期神经行为和后期学习记忆能力的变化,并从病理生理检测及在神经系统损伤中有重要提示作用的谷氨酸受体NMDA亚基的

基金项目:国家计生委科技攻关项目(2007B070)
Supported by the Tackling Project of Scientific and Technological Research of State Family Planning Commission(2007B070)
作者简介:张 红,女,重庆市人,硕士,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)68762073, E-mail:cbcqcn@163.com
通信作者:赵聪敏,电话:(023)68755602
收稿日期:2009-06-29;**修回日期**:2009-09-22

基因表达上进一步寻求证据,及时识别这些危险因素引起的实验动物神经系统早期亚临床表现,对下一步临床研究孕早期暴露家装空气污染物及高温对新生儿神经系统发育影响的早期诊断和及时干预有参考价值。

1 材料与方法

1.1 分组与处理

成年SD孕鼠22只,体质量210~220 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。实验室环境温度(25±1)℃,湿度(60±5)%;实验室内空气质量检测:甲醛浓度0.08 mg/m^3、苯浓度0.06 mg/m^3、甲苯浓度0.17 mg/m^3、二甲苯浓度0.15 mg/m^3,符合中华人民共和国空气质量标准GB/T 18883-2002的要求。动情期的雌雄大鼠按2∶1合笼,次日清晨雌鼠阴道内见阴栓确定为怀孕,定为怀孕的第1天(d1)。孕鼠22只,随机分成4组。染毒组6只,从d1~d10每天把孕鼠放在含苯6 μl、甲苯0.01 ml、二甲苯0.01 ml、甲醛0.2 ml的染毒柜中2 h;联合组(高温联合染毒)7只,从d1~d10每天把孕鼠放在38.5 ℃,含苯6 μl、甲苯0.01 ml、二甲苯0.01 ml,甲醛0.2 ml的染毒柜中2 h;高温组6只,从d1~d10每天把孕鼠放在38.5 ℃的染毒柜中2 h;对照组3只,从d1~d10每天把孕鼠放入空染毒柜中2 h,不放任何的污染物。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。实验期间及实验后各组孕鼠继续动物房喂养至分娩。

1.2 指标检测

1.2.1 一般指标 各组仔鼠出生体质量及出生后第3、7、14、19天的体质量。

1.2.2 大体观察指标 各组分别取5只新生大鼠和1月龄大鼠的大脑,在体视显微镜下观察神经管、体节和头部形态发育的情况。

1.2.3 仔鼠海马神经细胞凋亡检测 各组取5只新生大鼠和1月龄的大鼠常规麻醉,急性分离海马CA区的细胞,用Annexin联合PI双染色法经激光共聚焦扫描观察,其中凋亡细胞会与Annexin结合而发绿色荧光,而死亡细胞的细胞核会与PI结合,而显示红色荧光,计数不同组别不同视野(5个/组)海马CA1区神经元死亡和凋亡数量。

1.2.4 RT-PCR检测新生鼠海马NMDA受体功能亚基NR1基因的表达变化 各组取5只新生大鼠和1月龄的大鼠常规麻醉,分离海马,提取总RNA,测定并计算光密度$D(260)/D(280)$值及RNA浓度,按常规方法制备cDNA。NR1亚基引物序列:上游5′-TGGGGCGTCCTGCTCAACTC-3′,下游5′-AGCACGGCCGAGTCCCAGATA-3′,产物大小377 bp。内参照物为GAPDH,引物序列:上游5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′,下游5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′,产物大小159 bp。反应条件:94 ℃,5 min→(94 ℃,30 s→60 ℃,30 s→72 ℃,30 s)×30个循环→72 ℃,10 min。电泳结果采用Quantity one凝胶图像分析系统进行图像分析,计算吸光度值。

1.2.5 生后28 d大鼠采用morris水迷宫进行学习记忆能力检测 在进行实验前,水中倒入墨汁将水染为不透明,以从水面看不到平台和水底的参照物为准;实验过程中保持环境一致[包括水温保持在(22±1)℃,房间内光照恒定,无光线反射在水池内]和实验者相对位置不变。每次实验前都拍摄背景,以排除每次实验时光线等因素变化对实验的干扰。各组大鼠每日训练3次,共4 d,每日大鼠实验的先后顺序一定。将大鼠从Ⅰ、Ⅳ、Ⅱ 3个象限3点面向水池放入,并开始记时录像。实验第5天移走平台,将各组大鼠从Ⅰ象限S点放入水池,用摄像机记录大鼠60 s内的运动轨迹及穿越平台次数、目标区域游泳时间等。

1.3 统计学分析

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 体质量比较

不同组别仔鼠的出生体质量、3日、7日、14日、19日龄体质量之间均无显著性差别($P>0.05$)。

2.2 大体观察

各组新生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。

2.3 共聚焦检测急性分离的海马组织中死亡、凋亡神经细胞结果

刚出生时,染毒组、联合组、高温组死亡神经元的比例明显多于对照组($P<0.01$),联合组和高温组之间死亡神经元比例有显著差异($P<0.05$)。出生1个月后,染毒组与联合组死亡神经元的比例明显高于对照组和高温组($P<0.01$);尽管高温组死亡神经元的比例高于对照组,但两组之间无统计学差异。

刚出生时对照组、染毒组、联合组、高温组之间凋亡神经元的比例无统计学差异。出生1个月后染毒组、联合组、高温组凋亡神经元的比例均显著高于对照组($P<0.01$),但该3组之间无显著差异。见表1、2和图1、2。

表1 各组海马细胞急性分离后死亡神经元比例(死亡细胞数/视野总细胞数量,$n=5$,$\bar{x}\pm s$)

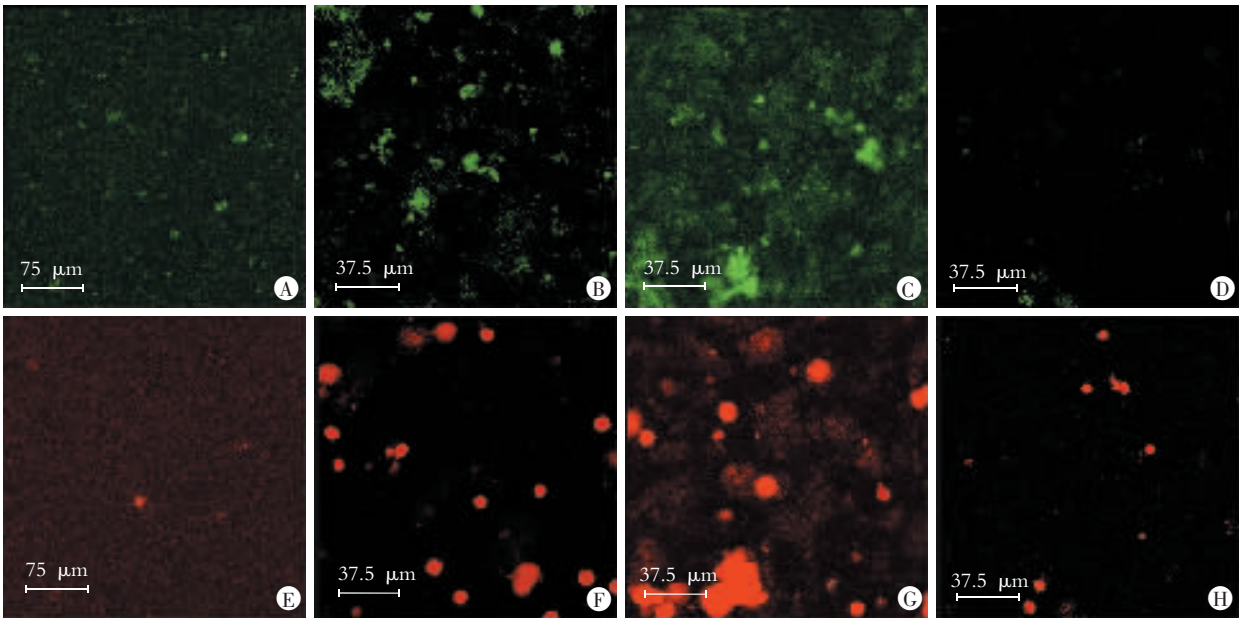
组别	出生	1月龄
对照组	0.08±0.03	0.07±0.03
染毒组	0.29±0.01[a]	0.23±0.05[ab]
联合组	0.24±0.04[ab]	0.20±0.01[ab]
高温组	0.33±0.06[a]	0.13±0.05

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与高温组比较

表2 各组海马细胞急性分离后凋亡神经元比例(凋亡细胞数/视野总细胞数量,$n=5$,$\bar{x}\pm s$)

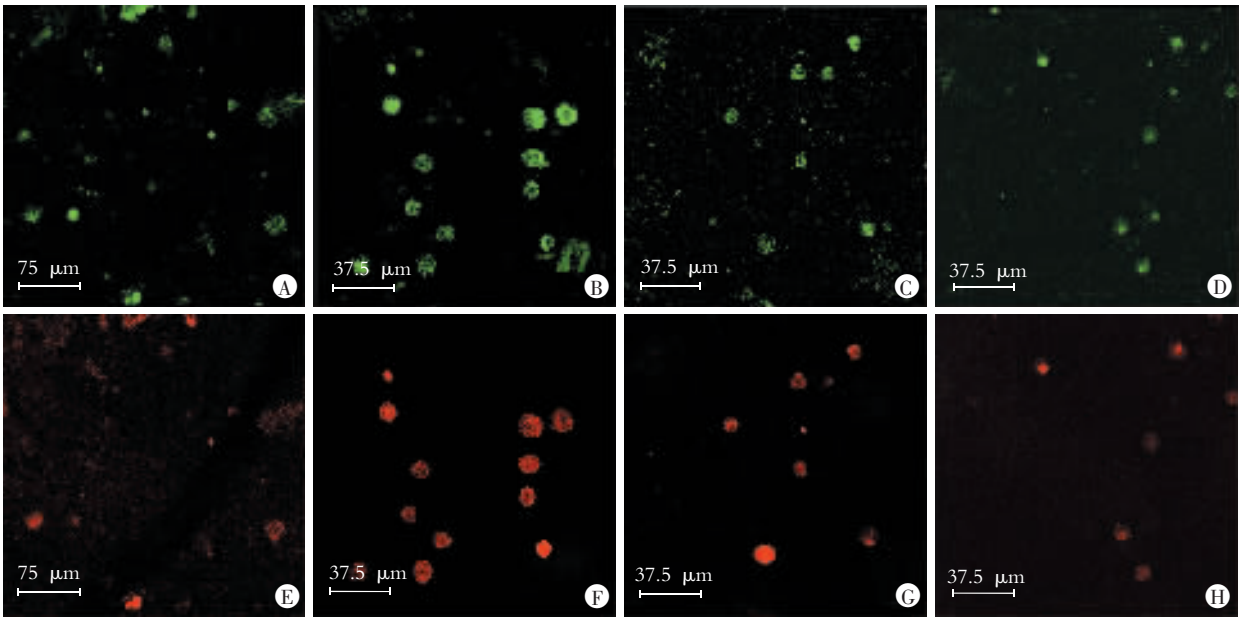
组别	出生	1月龄
对照组	0.10±0.05	0.07±0.03
染毒组	0.21±0.02	0.20±0.04[a]
联合组	0.15±0.06	0.24±0.07[a]
高温组	0.15±0.10	0.19±0.02[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较



A、E:对照组;B、F:染毒组;C、G:联合组;D、H:高温组;A、B、C、D:Annexin V 染色;E、F、G、H:PI 染色　被 Annexin V-FITC 染色呈绿色的细胞为凋亡早期细胞;被 PI 染色呈红色的细胞为死亡细胞

图 1　新生鼠海马凋亡和死亡神经细胞共聚焦显微镜观察



A、E:对照组;B、F:染毒组;C、G:联合组;D、H:高温组;A、B、C、D:Annexin V 染色;E、F、G、H:PI 染色　被 Annexin V-FITC 染色呈绿色的细胞为凋亡早期细胞;被 PI 染色呈红色的细胞为死亡细胞

图 2　出生 1 个月鼠海马凋亡和死亡神经细胞共聚焦显微镜观察

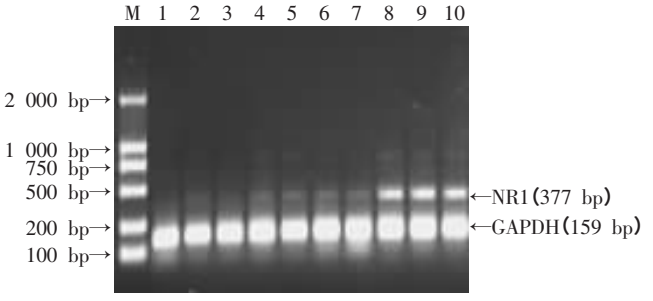
2.4　各组仔鼠海马 NR1 基因表达检测结果

不同组别仔鼠在出生时,其灰度值之间有显著性差异($P<0.01$),联合组($P<0.01$)、染毒组($P=0.013$)和高温组($P=0.021$)明显高于对照组,联合组明显高于染毒组和高温组($P<0.01$);不同组别仔鼠在 1 月龄时,其灰度值之间有显著性差异($P<0.01$),联合组($P<0.01$)、染毒组($P=0.017$)和高温组($P=0.027$)明显高于对照组,联合组明显高于染毒组和高温组($P<0.01$)。结果见表 3 和图 3、4。

表 3　各组仔鼠海马 NR1 表达变化($n=3$)

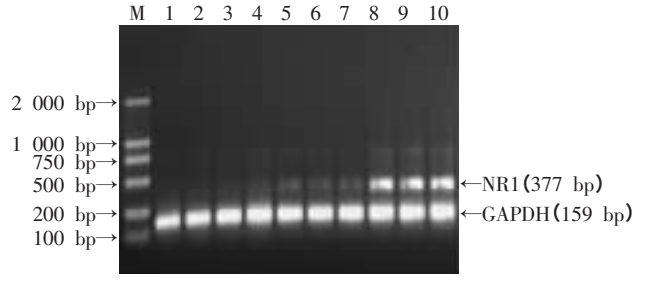
组别	出生	1 月龄
对照组	50.9 ±0.66	28.26 ±0.47
染毒组	63.9 ±4.80[a]	34.21 ±0.50[a]
联合组	225.5 ±6.34[bcd]	216.01 ±3.81[bcd]
高温组	62.7 ±1.56[a]	33.60 ±0.68[a]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较; c:$P<0.01$,与高温组比较; d:$P<0.01$,与染毒组比较



M:标准; 1:对照组; 2~4:染毒组; 5~7:高温组; 8~10:联合组

图3 刚出生时各组海马 NMDA 受体 NR1 表达



M:标准; 1:对照组; 2~4:染毒组; 5~7:高温组; 8~10:联合组

图4 出生1个月时各组海马 NMDA 受体 NR1 表达

2.5 行为学检测结果

不同组别仔鼠的穿越平台次数有显著性差别($F=35.05$, $P<0.01$)。联合组的穿越平台次数明显少于对照组、染毒组和高温组($P<0.01$),染毒组和高温组的穿越平台次数明显少于对照组($P<0.05$)。见表4。

表4 不同组别仔鼠的穿越平台次数($\bar{x}\pm s$)

组别	n	穿越平台次数(次)
对照组	5	7.83±1.17
染毒组	5	6.63±0.74[a]
联合组	5	3.75±0.71[bcd]
高温组	5	6.88±0.64[a]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较; c: $P<0.01$,与高温组比较; d: $P<0.01$,与染毒组比较

3 讨论

发育中的大脑对外界的污染物质具有特殊的敏感性。目前通常是分别研究家装污染和高温对神经系统的损害作用。甲醛是造成室内空气污染的主要物质之一,它可通过降低细胞能量代谢抑制神经元正常生理活动,进而导致整个神经系统功能的损伤。进一步研究发现胚胎甲醛染毒后,仔鼠除了神经系统可见的发育畸形外,通过电镜检测还可观察到大脑皮层神经细胞线粒体嵴断裂、肿胀和空泡样变,其相关酶如 SDH、AChE、Mg^{2+}-ATPase 活力下降,而 ACP、MAO 活力增强。而有关苯及衍生物神经毒性的研究主要在两大方面,即学习记忆功能及自主活动,长期低浓度吸入甲苯能造成不同程度的学习记忆功能障碍和短暂的空间记忆损害。而孕早期暴露于家装污染并联合高温环境对仔鼠神经系统行为学的影响还少见报道[2,3]。

在本研究中观察到染毒组、联合组、高温组和对照组新生鼠的体质量以及大脑形态发育无显著性差异($P>0.05$),说明在本研究中所使用的污染物浓度不会造成神经系统发育的明显缺陷。但是通过急性分离各组大鼠海马神经元,并利用激光共聚焦检测观察到:刚出生时,染毒组、联合组、高温组死亡神经元的比例明显多于对照组,但凋亡细胞的数量无显著差异,3个处理组之间死亡神经元数量无显著差异;出生后1个月,染毒组与联合组死亡神经元的比例明显高于对照组和高温组,尽管高温组死亡神经元的比例高于对照组,但2组之间无统计学差异。出生后1个月染毒组、联合组、高温组凋亡神经元的比例均显著高于对照组。该结果与我们前期的病理学检测结果[4]也具有较好的一致性,即在低污染物浓度下染毒,会引起新生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。同时对动物的早期反射形成明显的延迟作用[5,6]。

在中枢神经系统损伤过程中,兴奋性谷氨酸及其受体具有重要的作用,其中 N-甲基-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR 或 NR)则起着关键性的作用。NMDAR 广泛分布于中枢神经系统,与神经系统的发育和突触形成密切相关,并参与学习记忆、突触可塑性、缺血缺氧性脑损伤等许多神经退行性变的生理病理过程。现已发现 NMDAR 至少存在7个亚单位,NR1 是其主要的亚单位。研究表明,NR介导的谷氨酸神经兴奋性毒性作用在神经元损伤的众多环节中起着决定性的作用[4,7,8]。本研究观察到不同组别仔鼠在出生时,海马组织中 NR1 基因 mRNA 的表达有显著性差异($P<0.01$),联合组、染毒组和高温组明显高于空白组,其中联合组高于染毒组和高温组($P<0.01$);不同组别仔鼠在1月龄时,基因 mRNA 的表达也有显著性差异($P<0.01$),联合组、染毒组和高温组明显高于空白组,联合组明显高于染毒组和高温组($P<0.01$)。而且在海马 CA1 区,NR1 mRNA 表达增高的仔鼠,其海马组织中凋亡、死亡细胞也增多,提示二者之间可能存在着某种特定的关系。进一步研究表明,缺血缺氧以及其他形式的神经系统损伤可能导致脑内谷氨酸和天门冬氨酸大量释放,并过度激活 NMDAR, 使 Ca^{2+} 通道开放性增加,从而介导了兴奋性氨基酸(NMDAR 是兴奋性氨基酸的一种特异性受体)的神经毒性作用,最终导致神经元发生退行性改变和坏死[9,10]。

行为测试可作为毒性作用发生的最早检测指标之一。在其他典型毒性症状出现之前,毒性效应即可能在行为上有一定的表现[11]。Morris 水迷宫实验是一种用于检测空间学习、记忆能力的实验, 可系统、全面

地考察实验动物空间认知加工的过程，客观地反映其认知水平，可对动物主动回避反应能力进行检测。本研究结果显示，在空间探索实验中，不同组别仔鼠的穿越平台次数有显著性差别（$F=35.05$，$P<0.01$）。联合组的穿越平台次数明显少于对照组、染毒组和高温组（$P<0.01$），染毒组和高温组的穿越平台次数明显少于对照组（$P<0.05$）。表明在高温或家装污染的联合作用下小鼠在目标象限的游泳时间逐渐缩短，更多地表现为对目标的无效搜索，说明在上述两种条件下均对大鼠的学习记忆能力有损害作用，影响了小鼠脑的高级神经活动[12-14]。其中高温和染毒的联合作用可加重损害，这也与前述学习记忆密切相关的海马神经元死亡和凋亡的改变以及NR1亚单表达的结果具有很好的一致性。

综上所述，家装污染与高温联合作用会对新生鼠神经系统的发育产生明显的损害。为预防外界环境因素对人胎儿神经系统发育产生潜在的不良影响，妊娠妇女应该尽量避免处于污染物与高温的环境中。

参考文献：

[1] 余 俐，徐如祥，姜晓丹，等. 高温高湿环境对大脑组织的损害作用[J]. 中国临床康复，2004，8(25)：5290-5291.
[2] 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.
[3] 刘慧娟，贾德永，丰慧根，等. 高温联合辐射对孕鼠胚胎神经系统发育的影响[J]. 新乡医学院学报，2005，22(1)：11-12.
[4] 张 红，赵聪敏，张雨平，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2009，31(9)：788-790.
[5] 耿明英，吴松笛，万 琪. 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.
[6] 邓朝晖，汪 峰，余晓东，等. 环境电磁辐射对大鼠海马神经细胞黏附分子表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(12)：1317-1319.
[7] Rao V R，Finkbeiner S. NMDA and AMPA receptors：old channels，new tricks[J]. Trends Neurosci，2007，30(6)：284-291.
[8] 秦 明，王景杰，段 丽，等. 高湿热环境下谷氨酸及其受体在大鼠下丘脑的表达变化[J]. 解剖学报，2007，38(1)：9-12.
[9] Wang W P，Iyo A H，Miguel-Hidalgo J，*et al*. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons[J]. Brain Res，2006，1084(1)：210-216.
[10] 柯 珂，朱 燕，乔 琰，等. 吸入甲醛对小鼠前脑NMDA-R基因转录的影响[J]. 环境科学学报，2007，27(2)：282-288.
[11] Bonde C，Noraberg J，Noer H，*et al*. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures[J]. Neuroscience，2005，136(3)：779-794.
[12] 杨在明，裘著革，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.
[13] 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 Rehabil，2005，9(16)：251-253.
[14] 贾德永，刘慧娟，丰慧根，等. 高温联合辐射致仔鼠神经行为异常研究[J]. 实用儿科临床杂志，2005，20(1)：42-44.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2009)22-2185-01

个案与短篇

红药气雾剂治疗老年消化道肿瘤患者静脉炎的疗效观察

袁昌琼，孙彩红 （解放军总医院南楼消化科，北京 100853）

通过外周静脉输注化疗药物治疗肿瘤在临床已广泛应用。化疗药物的毒副作用强，容易导致静脉及其周围局部组织出现静脉炎相关症状，主要表现为红肿、灼痛、条索状物等[1,2]。老年患者血管细，管壁薄，弹性差，易受损，静脉炎的发生率较高[3]，给患者带来很大的痛苦，也给医护人员的治疗护理带来一定的困难。2007年1月至2008年4月，本院采用红药气雾剂局部外涂治疗静脉炎取得满意效果，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组60例患者，年龄（79±2）岁，男性56例，女性4例。患者入院时均诊断为消化道肿瘤，有胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌等。化疗药物有顺铂、5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、长春新碱、表阿霉素、环磷酰胺等。随机分为2组：实验组30例，对照组30例。2组患者在年龄、性别、肿瘤类型、静脉炎分度、治疗疗程方面无统计学差异（$P>0.05$），具有可比性。

1.2 静脉炎的分级标准[4]

Ⅰ度：局部疼痛、红肿或水肿，静脉无条索状改变，未触及硬结；Ⅱ度：局部疼痛、红肿或水肿，局部条索状改变，未触及硬结；Ⅲ度：局部疼痛、红肿或水肿，静脉条索状改变，可触及硬结。

1.3 治疗方法

试验组用红药气雾剂沿血管方向10 cm×8 cm范围喷洒，按摩皮肤5~10 min，以促进药物吸收，4次/d。对照组用50%的硫酸镁浸润的无菌纱布湿敷在静脉炎皮肤处，用塑料膜包裹，4次/d。用药前观察静脉炎的症状，1周为1个疗程。

1.4 疗效判断标准

显效：局部疼痛、红肿、灼热消失；有效：局部伴有轻微红肿、疼痛；无效：治疗后症状无明显改善。

（下转2198页）

作者简介：袁昌琼，女，重庆市人，护师，主要从事临床内科护理工作。电话：(010)66875435，E-mail：yuanchangqiong@163.com

收稿日期：2009-02-12；修回日期：2009-04-16