DOI:10.16016/j.1000-5404.201512132

出生后早期镉暴露诱导小鼠生理及神经行为发育改变

张玉媛,王春华,王 允,陈 雪,章 宏,周燕妮 (233030 安徽 蚌埠,蚌埠医学院预防医学系)

[摘要] **目的** 观察出生后早期镉暴露对仔鼠生理发育及神经行为发育的影响,探讨相关损伤机制。**方法** 采用生理及神经行为学检测方法。新生 ICR 仔鼠 40 只,随机分为氯化镉($CdCl_2$)2.0、1.0、0.5 mg/kg 暴露组和生理盐水对照组,每组 10 只,从出生后 3~13 d 进行腹腔注射染毒,隔天 1 次,末次染毒后 24 h 检测仔鼠脑组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量,部分半脑进行神经病理学检查;剩余动物观察至出生后 35 d 发育成熟后取脑进行神经病理学检查、称取各脏器质量计算脏器系数。**结果** $CdCl_2$ 2.0、1.0 mg/kg 组脑组织 MDA 水平显著增加($P<0.05$),2.0 mg/kg 组 GSH 活力低于其他各组($P<0.05$);$CdCl_2$ 2.0、1.0 mg/kg 组开眼时间延迟($P<0.05$),各暴露组旷场探索达标时间显著延迟($P<0.05$),$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组悬崖回避达标时间有一定影响($P<0.05$);脑组织神经病理学检查发现 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组大脑皮层椎体细胞排列较对照组稀疏。**结论** 出生后早期接触镉能够诱导小鼠生理及神经行为发育改变。

[关键词] 镉;新生鼠;发育;氧化应激;大脑皮层
[中图法分类号] R-332;R339.31;R995 [文献标志码] A

Physiological and neurobehavioral changes in newborn mice exposed to cadmium at early life

Zhang Yuyuan, Wang Chunhua, Wang Yun, Chen Xue, Zhang Hong, Zhou Yanni (Faculty of Preventive Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province, 233030, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effect of cadmium exposure in the early period after birth on physiological and neurobehavioral changes in newborn mice and explore the related mechanism. **Methods** Newborn ICR mice were randomly divided into 4 groups, with 10 mice in each group. The 4 groups were injected intraperitoneally with cadmium chloride at 2.0, 1.0, 0.5 and 0 mg/kg, respectively, every other day from postnatal day (PND) 3 to PND 13. Some mice were killed at 24 h after the last exposure to measure MDA and GSH levels in the brain and observe the brain neuropathological changes. The rest mice were fed until PND 35, and the neuropathological tests were performed. The organs including the brains, liver, lungs, kidneys, uterus and testes were taken out and weighed. Brain slices were stained with HE to examine the brain neuropathological changes. **Results** MDA level was significantly higher in the 2.0 mg/kg group and 1.0 mg/kg group ($P<0.05$), and the activity of GSH in 2.0 mg/kg group was lower than that of the other groups ($P<0.05$). The eye opening time in 2.0 mg/kg group and 1.0 mg/kg group was delayed ($P<0.05$). The sensorimotor abilities including cliff aversion and open field traversal were affected in the exposure groups ($P<0.05$). The neuropathological test showed that the cerebral cortex cells were more loose in the 2.0 mg/kg group than those in the control group. **Conclusion** Cadmium exposure in the early period after birth induces physiological and neurobehavioral changes in mice.

[基金项目] 安徽省高校自然科学研究项目(KJ2015A212);安徽省特色专业-预防医学-项目[皖教高(2011)5 号];蚌埠医学院自然科学研究项目(BYKY1449)

[通信作者] 张玉媛, E-mail: zhyy8727@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160309.0941.010.html(2016-03-09)

[**Key words**] cadmium; newborn mice; development; oxidative stress; cerebral cortex

Supported by the Natural Science Research Project of Colleges and Universities in Anhui Province (KJ2015A212), the Characteristic Specialty Project of Preventive Medicine in Anhui Province (2011-5) and the Natural Science Research Project of Bengbu Medical College (BYKY1449). Corresponding author: Zhang Yuyuan, E-mail: zhyy8727@126.com

镉(Cd)是一种应用广泛的重金属,其污染已经由职业环境扩散至日常生活。日常生活中的暴露途径多样,如食物、饮水、吸烟[1],这种重金属甚至能分泌至乳汁中继而影响婴幼儿[2],镉半衰期很长(15~40年),同时排出率很低[3],它可以在体内很多器官蓄积进而导致多系统、器官损伤,如肾脏[4]、肺[5]、神经系统[6]等。镉对成年人的健康损伤研究报道很多,但对于出生后暴露引起儿童损伤的相关性研究较少[7]。由于镉暴露的广泛性,婴幼儿在出生后早期即可通过乳汁接触到镉[2,8];同时,出生前后也是中枢神经系统(central nervous system,CNS)易受损害的时期,这可能与发育中的脑屏障功能尚不完善、通透性较高、不能有效阻止外源化学物(如镉)进入大脑干扰其正常的发育有关。因此,镉在出生后早期暴露引起的毒性作用不容忽视[9]。本研究观察出生后早期镉暴露仔鼠生理发育及神经行为发育,观察幼年时期镉暴露对仔鼠生理发育及神经行为发育的影响,以期为进一步探讨其毒作用机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

健康清洁级ICR小鼠,雌性体质量26~28 g,雄性体质量30~32 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司[许可证号:SCXK(苏)2011-0003],按雄雌2∶4于PM 9:00合笼,次日AM 7:00检查雌鼠阴栓,查到阴栓者定为受孕第0天(gestational day,GD0),出生后每窝仔鼠数量调整为10只,不足10只的窝舍弃。氯化镉($CdCl_2$)分析纯购于国药集团化学试剂有限公司,丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,考马斯亮蓝测定脑组织中蛋白质浓度。

1.2 动物分组

新生仔鼠按完全随机分组法分为4组,分别为$CdCl_2$ 2.0、1.0、0.5 mg/kg暴露组和生理盐水(NS)对照组。在仔鼠出生后3、5、7、9、11、13 d,所有仔鼠称量后经腹腔接触不同剂量的$CdCl_2$或生理盐水,暴露时间内注射部位无炎症性反应。

1.3 仔鼠观察

观察仔鼠在性成熟前的生长和发育状态,出生后不同时间观察相关发育指标,每次均由固定的检查者检查各组仔鼠的发育指标,包括生理发育指标:出生后体质量、耳郭分离、门齿萌出、睁眼、睾丸下降、阴道张开;运动和协调功能测试:爬行、前肢悬挂、旷场行走;反射和感觉功能试验:平面翻正、负趋地性、悬崖回避、空中翻正。

1.4 脑氧化应激指标测定

出生后14 d即末次染毒24 h后,部分动物颈椎脱臼处死后冰上沿延髓平面取出脑组织,冰冷生理盐水冲洗,滤纸吸干并称量,中央沟切开双侧大脑。半脑制成浓度为10%的脑组织匀浆,按质量(g):体积(mL)=1:9加入生理盐水,4 000 r/min离心10 min,收集上清后按照试剂盒操作规程进行MDA、GSH测定;另半脑进行神经病理学检查。出生后35 d,剩余实验动物颈椎脱臼法处死后,取出大脑、肺、肝脏、肾脏、子宫或睾丸称质量,以公式(1)计算各脏器系数,取脑称量后进行神经病理学检查。

$$脏器系数 = 脏器质量(g)/体质量(g) \times 100 \quad (1)$$

1.5 脑组织神经病理学检查

中央沟切开双侧大脑后,半脑用4%多聚甲醛固定,常规脱水后冠状面切开标本,视交叉朝底,进行石蜡包埋、连续切片(片厚6 μm)、展片、脱蜡、HE染色,镜下神经病理学检查。

1.6 体质量和脏器质量

在镉暴露期间,即出生后3~13 d仔鼠每天称量1次,从出生后14 d开始每周1次。在第35天,剩余实验动物颈椎脱臼法处死后,取出大脑、肺、肝脏、肾脏、子宫或睾丸称量,以公式(1)计算各脏器系数。

1.7 统计学分析

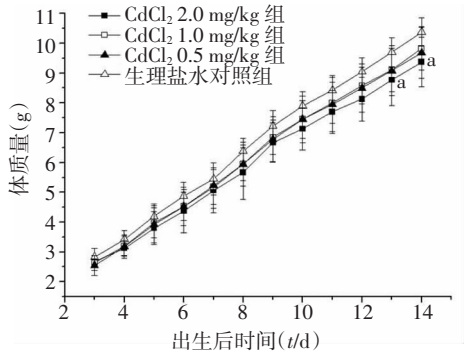
采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,各组均数比较采用单因素方差分析,q检验比较两两差异性。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 出生后体质量的影响

出生后体质量数据显示:仅$CdCl_2$ 2.0 mg/kg组体质量在13、14 d低于其他各组($P<0.05$),其余各组体质量增长程度在染毒期间改变差异无统计学意义

($P>0.05$,图1)。



a:$P<0.05$,与生理盐水对照组比较

图1 对照组及各 $CdCl_2$ 暴露组仔鼠体质量的变化

2.2 $CdCl_2$ 暴露对仔鼠大脑 MDA、GSH 活力的影响

与生理盐水对照组比较,$CdCl_2$ 2.0、1.0 mg/kg 组 MDA 水平显著增加($P<0.05$),$CdCl_2$ 0.5 mg/kg 组差异没有统计学意义($P>0.05$);$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组 GSH 水平低于生理盐水对照组($P<0.05$,表1);暴露各组 MDA、GSH 水平呈现剂量依赖性(MDA:$r=0.98$,$P<0.05$;GSH:$r=0.91$,$P<0.05$)。

表1 $CdCl_2$ 暴露对出生后14 d仔鼠脑 MDA、GSH 活力的影响($n=10$,$\bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	GSH(mg/g)
$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组	13.9±7.2[a]	98.6±41.0[a]
$CdCl_2$ 1.0 mg/kg 组	12.3±7.8[a]	123.1±23.1
$CdCl_2$ 0.5 mg/kg 组	9.3±5.3	125.7±26.8
生理盐水对照组	5.1±4.9	147.6±38.4

a:$P<0.05$,与生理盐水对照组比较

2.3 $CdCl_2$ 暴露对仔鼠生理发育的影响

与生理盐水对照组比较,仅开眼与阴道开启时间差异有统计学意义($P<0.05$),其余各观察指标差异没有统计学意义($P>0.05$)。说明镉暴露可推迟仔鼠开眼时间。与生理盐水对照组比较,$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组推迟了约1 d,同样阴道开启时间推迟了约2 d(表2)。

2.4 $CdCl_2$ 暴露对仔鼠神经行为发育的影响

与生理盐水对照组比较,$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组悬崖回避达标时间延迟至(7.2±0.7)d($P<0.05$);旷场行走实验各组差别显著,所有暴露组均落后于生理盐水对照组($P<0.05$);其余神经行为发育未发现异常(表3)。

2.5 $CdCl_2$ 暴露对出生后35 d仔鼠脏器系数的影响

出生后35 d,$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组肝/体质量值以及子宫/体质量值显著高于生理盐水对照组,睾丸/体质量值低于生理盐水对照组($P<0.05$,表4)。

2.6 对照组及 $CdCl_2$ 暴露各组仔鼠脑组织病理学检查

出生后14 d及35 d,生理盐水对照组小鼠大脑皮层各层分界清晰,细胞密度高于 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组,同时细胞排列整齐、饱满,而 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组皮层各层界限不清晰,同时细胞胞体变小甚至缺失(图2)。

表2 对照组及 $CdCl_2$ 暴露对仔鼠生理发育的影响[$n=10$,($\bar{x}\pm s$) d]

组别	耳郭分离	门齿萌出	开眼时间	睾丸下降	阴道开启
$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组	4.9±0.3	11.6±0.5	15.6±0.5[a]	23.6±0.5	32.6±2.4[a]
$CdCl_2$ 1.0 mg/kg 组	4.7±0.5	11.1±0.3	14.8±0.4[a]	23.0±0.2	31.5±1.7
$CdCl_2$ 0.5 mg/kg 组	4.7±0.2	11.1±0.3	14.1±0.3	22.4±1.1	30.0±1.2
生理盐水对照组	4.5±0.5	11.5±0.6	14.3±0.6	22.3±1.2	30.6±0.8

a:$P<0.05$,与生理盐水对照组比较

表3 对照组及 $CdCl_2$ 暴露对仔鼠神经行为发育的影响[$n=10$,($\bar{x}\pm s$) d]

组别	平面翻正	负趋地性	悬崖回避	前肢悬挂	旷场行走	空中翻正
$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组	5.2±0.6	6.5±0.8	7.2±0.7[a]	9.9±1.4	14.5±1.5[a]	14.2±0.5
$CdCl_2$ 1.0 mg/kg 组	4.7±0.7	5.8±0.8	6.7±0.5	9.0±1.0	13.9±0.7[a]	13.8±0.4
$CdCl_2$ 0.5 mg/kg 组	4.9±0.2	6.3±1.9	6.5±0.9	8.9±0.8	13.5±0.5[a]	13.7±0.8
生理盐水对照组	4.8±1.1	6.1±1.7	6.2±1.1	8.6±1.2	12.5±1.3	13.8±1.0

a:$P<0.05$,与生理盐水对照组比较

表4 对照组及 $CdCl_2$ 暴露对出生后35 d小鼠体质量及脏器系数的影响($n=10$,$\bar{x}\pm s$)

组别	体质量(g)	大脑(%)	肝脏(%)	肺(%)	肾脏(%)	子宫(%)	睾丸(%)
$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组	29.62±3.69	1.11±0.15	6.82±1.38[a]	0.61±0.23	1.20±0.30	0.61±0.16[a]	0.64±0.16
$CdCl_2$ 1.0 mg/kg 组	30.40±4.62	1.06±0.12	5.79±0.34	0.65±0.12	1.09±0.08	0.43±0.18	0.50±0.14[a]
$CdCl_2$ 0.5 mg/kg 组	31.99±2.23	1.00±0.06	5.94±0.23	0.62±0.08	1.16±0.10	0.43±0.15	0.55±0.04
生理盐水对照组	29.90±1.60	1.07±0.06	5.15±0.36	0.61±0.09	1.14±0.13	0.40±0.10	0.66±0.03

a:$P<0.05$,与生理盐水对照组比较

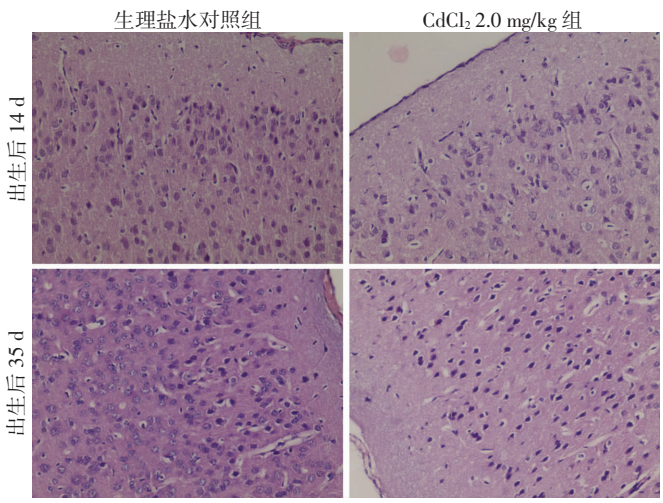


图 2 HE 染色观察小鼠大脑皮层组织病理学改变 (×400)

3 讨论

有研究报道,在出生早期的发育过程中,中枢神经系统容易受到影响而出现损伤[9]。由于出生后大脑功能还没有发育完善,因此出生后镉暴露对神经系统的影响应引起重视[10-11]。本实验通过检测 $CdCl_2$ 暴露对仔鼠生理和神经行为发育指标[12],评价镉对新生动物的影响。

本研究发现除 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组在出生后 13、14 d 体质量增加受影响,其余暴露组与生理盐水对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);镉暴露可影响仔鼠的开眼时间,$CdCl_2$ 2.0、1.0 mg/kg 组开眼时间均延迟。啮齿类动物的开眼时间可作为视觉系统发育的一个标志[13],视皮层在出生后仍处于继续发育状态[14],经历了非视觉经验依赖的拓扑投射的发育阶段(出生后到睁眼)和视觉经验依赖性的发育阶段(睁眼后至发育成年),因此,开眼时间是否达标一方面反映了拓扑投射的发育阶段是否发育正常,另一方面也影响了开眼后视觉系统的进一步发育。因此,我们推测出生后早期镉暴露有可能干扰到视觉系统的早期发育完善,直接影响动物的开眼时间,随着开眼时间的延迟,视觉系统的进一步发育受到影响。本研究也显示 $CdCl_2$ 暴露剂量低于 2.0 mg/kg 时各组体质量没有显著差别,但是 $CdCl_2$ 1.0 mg/kg 组也表现出开眼时间延迟,提示在出现明显的器质性损伤前已经出现一定的功能性损伤,因此幼年时期镉暴露引起的这种功能性损伤容易引起人们的忽视。

平面翻正和空中翻正反映了后代运动反射能力,负趋地性和悬崖回避反映了躯体感觉运动能力,前肢悬挂用以判断动物的耐力,旷场探索实验用于评价动物的活动度和情绪[15-16]。本研究显示,与生理盐水对照组比较,平面翻正、负趋地性、前肢悬挂和空中翻正各暴露组差异无统计学意义,但各暴露组旷场探索达标时间均显著延迟,2.0 mg/kg 组悬崖回避达标时间有一定影响。提示镉对仔鼠的运动功能和耐力没有明显影响,但会影响感觉运动和活动度。

镉能够诱导产生活性氧(ROS)[17]。有研究指出,出生后早期接触镉引起的毒性作用与氧化应激有关[8],这可能因为中枢神经系统是高耗氧量器官,抗氧化能力较其他器官差,易于遭受 ROS 的攻击,并且出生后个体生长发育迅速、代谢速率高同时抵抗 ROS 的保护机制还没有发育完全。本研究染毒 24 h 后对动物脑部取材进行生化指标的检测,结果显示,实验动物大脑 MDA 含量增加,GSH 浓度下降,GSH 可清除体内多余的氧自由基,对生物体起保护作用,MDA 水平可间接反映细胞氧化损伤的程度[18],提示出生后接触镉诱导大脑出现氧化应激损伤。

在出生后 35 d 对动物称质量取材后发现,大脑、肺、肾脏的脏器系数各组间差异无统计学意义。但是 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组肝体比显著高于生理盐水对照组,镉暴露有可能导致肝脏病理性增重,譬如诱导肝脏炎症性反应、凋亡和肝脏细胞再生等[19]。$CdCl_2$ 1.0 mg/kg 组睾丸相对质量减轻,以往的研究也提示镉暴露使生精小管的长度和直径减小,继而导致睾丸质量减轻[20-21]。$CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组子宫相对质量增加,镉暴露可以延迟动物阴道开启时间。这些结果提示出生后早期接触镉可影响肝脏和生殖系统,相关作用机制研究值得进一步研究。

对出生后 14、35 d 仔鼠大脑神经病理学检查发现,出生后 14 d 小鼠 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组皮层细胞排列较生理盐水对照组稀疏,椎体细胞数量减少,说明出生后早期接触镉影响了大脑皮层细胞的正常发育;实验动物停止暴露镉后至出生后 35 d 病理学检查结果提示,大脑皮层生理盐水对照组细胞较 $CdCl_2$ 2.0 mg/kg 组排列整齐饱满,提示该剂量组动物的大脑皮层形态和功能可能受到镉的影响,同时也提示幼年时期造成的这种损伤是不可逆的。

综上所述,本研究剂量下出生后早期的镉暴露影响了仔鼠的生理和神经行为功能的发育,氧化应激损伤可能是其毒作用机制之一,幼年时期镉暴露引起的机体损伤尤其是对神经系统的损伤应引起我们的重视。

参考文献:

[1] Jarup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 238(3): 201-208. DOI: 10.1016/j.taap.2009.04.020

[2] Winiarska-Mieczan A. Cadmium, lead, copper and zinc in breast milk in Poland[J]. Biol Trace Elem Res, 2014, 157(1): 36-44. DOI: 10.1007/s12011-013-9870-x

[3] Asara Y, Marchal J A, Carrasco E, *et al*. Cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 16600-16616. DOI: 10.3390/ijms140816600

[4] Kim B M, Lee S Y, Jeong I H. Influence of squid liver powder on accumulation of cadmium in serum, kidney and liver of mice[J]. Prev Nutr Food Sci, 2013, 18(1): 1-10. DOI: 10.3746/pnf.2013.18.1.001

[5] Wu K C, Liu J J, Klaassen C D. Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 263(1): 14-20. DOI: 10.1016/j.taap.2012.05.017

[6] Liu J, Qu W, Kadiiska M B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 238(3): 209-214. DOI: 10.1016/j.taap.2009.01.029

[7] Cao Y, Chen A, Radcliffe J, *et al*. Postnatal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age[J]. Environ Health Perspect, 2009, 117(10): 1580-1586. DOI: 10.1289/ehp.0900765

[8] Kippler M, Hossain M B, Lindh C, *et al*. Early life low-level cadmium exposure is positively associated with increased oxidative stress[J]. Environ Res, 2012, 112: 164-170. DOI: 10.1016/j.envres.2011.11.012

[9] Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects[J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 898034. DOI: 10.1155/2013/898034

[10] Ohtani-Kaneko R, Tazawa H, Yokosuka M, *et al*. Suppressive effects of cadmium on neurons and affected proteins in cultured developing cortical cells[J]. Toxicology, 2008, 253(1/3): 110-116. DOI: 10.1016/j.tox.2008.08.021

[11] Yoshida M, Honda A, Watanabe C, *et al*. Neurobehavioral changes in response to alterations in gene expression profiles in the brains of mice exposed to low and high levels of mercury vapor during postnatal development[J]. J Toxicol Sci, 2014, 39(4): 561-570.

[12] Nagao T, Kawachi K, Kagawa N, *et al*. Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A[J]. J Toxicol Sci, 2014, 39(2): 231-235.

[13] Ba A. Paradoxical effects of alcohol and thiamine deficiency on the eye opening in rat pups[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(11): 2435-2440. DOI: 10.3109/14767058.2012.703712

[14] 蒋斌, 李硕, 张琴芬. 早期视觉环境与视觉功能发育[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2013, 34(6): 577-582.

[15] 李勇, 张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 184.

[16] Gandhi D N, Panchal G M, Dhull D K. Neurobehavioral toxicity in progeny of rat mothers exposed to methylmercury during gestation[J]. Ann Ist Super Sanita, 2014, 50(1): 28-37. DOI: 10.4415/ANN_14_01_05

[17] Park J Y, Seo Y R. The protective role of nrf2 in cadmium-induced DNA damage[J]. Mol Cell Toxicol, 2011, 7(1): 61-66. DOI: 10.1007/s13273-011-0009-x

[18] Fattman C L, Schaefer L M, Oury T D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(3): 236-256.

[19] Habeebu S S, Liu J, Liu Y, *et al*. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium[J]. Toxicol Sci, 2000, 55(1): 223-232.

[20] de-Souza-Predes F, Diamante M A, Dolder H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats[J]. Int J Exp Pathol, 2010, 91(2): 125-131. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2009.00692.x

[21] Blanco A, Moyano R, Vivo J, *et al*. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2007, 23(1): 96-101. DOI: 10.1016/j.etap.2006.07.008

(**收稿**:2015-12-22;**修回**:2016-01-18)

(编辑 吴培红)