

大鼠孕期尼古丁暴露致成年雌性子代抑郁症易感机制研究

余樱^{1,3}, 石昭坤¹, 徐丹^{2,3}, 张兆辉^{1,3}, 汪晖^{2,3}

摘要 目的:探讨大鼠孕期尼古丁暴露(PNE)致成年雌性子代抑郁症易感的宫内发生机制。**方法:**将受孕Wistar大鼠随机分为对照组和PNE组,PNE组大鼠于孕9~20 d皮下注射尼古丁2 mg/(kg·d),2次/日。部分子代大鼠于孕20 d取脑切片NeuN免疫荧光染色观察前额叶皮质和海马形态改变;部分大鼠正常出生喂养至3月龄,给予慢性不可预见性温和刺激(CUMS),检测刺激前后雌性子代大鼠行为学改变,实时定量PCR检测前额叶皮质和海马组织中与突触生长发育相关基因的表达。**结果:**与对照组相比,旷场试验中PNE组成年雌性子代大鼠CUMS后表现为总路程、总速率和直立次数明显减少($P<0.05$),粪便粒数增加($P<0.05$),强迫游泳实验中不动时间明显延长($P<0.01$),表现出抑郁行为;PNE组孕20 d胎鼠前额叶皮质变薄,海马细胞层结构不清,轴突不连续;CUMS后PNE组成年子代前额叶皮质和海马,突触生长发育相关基因NR1、NR2A、NR2B、Syn I和Snap25 mRNA转录水平明显下降($P<0.01$)。**结论:**PNE导致大鼠成年雌性子代应激后抑郁症易感性增加,可能与子代前额叶皮质和海马神经元和突触形成发育等基因转录水平降低,所致前额叶皮质和海马结构和功能改变有关。

关键词 孕期尼古丁暴露;子代;抑郁症;前额叶皮质;突触

中图分类号 R741;R749 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.06.001

Study on the Mechanism of Increased Susceptibility to Depression in Adult Female Rats Offspring Resulting from Prenatal Nicotine Exposure YU Ying^{1,3}, SHI Zhao-kun¹, XU Dan^{2,3}, ZHANG Zhao-hui^{1,3}, WANG Hu^{2,3}. 1. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Hubei Provincial Key Laboratory of Developmentally Originated Disease, Wuhan 430071, China

Abstract Objective: To investigate the possible intrauterine mechanism of increased susceptibility of depression in adult female rats offspring resulting from prenatal nicotine exposure (PNE). **Methods:** Pregnant Wistar rats were randomly divided into control and PNE groups. PNE rats were given nicotine (2 mg/kg·d) by subcutaneous injection from the 9th day to the 20th day of gestation. Brain sections were taken of some offspring rats on the 20th day of pregnancy, and NeuN staining was performed to observe morphological changes in the prefrontal cortex and hippocampus. The other offspring rats were raised to 3 months old and given chronic unpredictable mild stimulation (CUMS). The behavioral changes of female offspring rats were observed before and after stimulation. Real-time quantitative PCR was used to detect expression of genes related to synapse formation in the prefrontal cortex and hippocampus. **Results:** Compared with the control group, the female rats in the PNE group showed significant decrease in total distance traveled and total rate after CUMS in the open-field test ($P<0.05$). The frequency of upright position decreased also ($P<0.05$). However, the quantity of feces was increased in the PNE group ($P<0.05$). In the forced swimming test, adult female offspring in the PNE group showed significantly longer immobility time than those in the control group ($P<0.01$), displaying depressive behavior. Fetal offspring in the PNE group showed thinner prefrontal cortex and unclear cell layers in the hippocampus with incomplete axons. The mRNA expression of NR1, NR2A, NR2B, Syn I, and Snap25 in the prefrontal cortex and hippocampus was significantly decreased after CUMS in adult offspring of the PNE group compared to those of the control group ($P<0.01$). **Conclusion:** Exposure to nicotine during pregnancy in rats leads to an increased susceptibility to depression in their adult female offspring, which may be related to decreased expression of genes involved in the development of neurons and synapses in the prefrontal cortex and hippocampus, resulting in changes in the structure and function of the prefrontal cortex and hippocampus.

Key words prenatal nicotine exposure; offspring; depression; prefrontal cortex; synapse

研究表明,烟草的主要成分尼古丁会干扰重要的发育事件,如大多数脑区的神经发生和早期的突触形成^[1-3]。孕期母亲抽烟与

子代精神心理行为异常如抑郁症等有独立相关性^[4,5],但其宫内发生机制并不明确。本研究检测了孕期尼古丁暴露(prenatal

作者单位

1. 武汉大学人民医院神经内科
武汉 430060

2. 武汉大学基础医学院药理学系
武汉 430071

3. 湖北省发育源性疾病重点实验室
武汉 430071

基金项目

国家自然科学基金
(No. 81300984)

收稿日期

2018-03-17

通讯作者

张兆辉

zhzhqing1990@

163.com

nicotine exposure, PNE)的子代雌性大鼠成年后慢性应激下的行为学改变,并探讨其可能的宫内发生机制。

1 材料与方法

1.1 动物处理及取材

健康 Wistar 大鼠[SCXK(鄂)2008-0005]由武汉大学医学院实验动物中心提供,雌性体质量 180~220 g,雄性体质量 220~250 g。每晚 6 时雌雄大鼠 2:1 合笼,次晨取阴道分泌物涂片镜检,发现精子为妊娠 0 d。将受孕大鼠随机分为对照组和 PNE 组,PNE 组于孕 9~20 d 皮下注射尼古丁 2 mg/(kg·d),于 8:00 和 20:00 各注射 1 次;对照组大鼠皮下注射同等剂量生理盐水。部分孕鼠在孕 20 d 麻醉处死取胎鼠脑组织;部分仔鼠自然生产后常规饲养至 3 月龄。所有大鼠 24 °C 左右的温度下饲养,每 12 h 昼夜循环。

1.2 方法

1.2.1 慢性不可预测性温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS) 对出生后 3 月龄的大鼠进行 21 d 的 CUMS,包括禁食、禁水、夹尾、4 °C 冰水游泳、45 °C 烘箱热烘或昼夜颠倒。每天随机选择 1 种刺激,每 1 种应激至少出现 2 次,2 种相同的刺激不连续出现。

1.2.2 行为学检测 ①旷场试验:在安静的实验环境下,手提鼠尾将大鼠轻轻放在大小为 120 cm×90 cm×35 cm 的铁质敞箱箱底中心, Ethovision 3.0 (Noldus, The Netherlands) 电脑摄像、记录大鼠 10 min 的行为,行为包括总路程、总速率、中心路程、中心速率、粪便粒数、直立次数。每只大鼠实验后,用 75%酒精清除箱内残留物和气味。②强迫游泳实验:将大鼠放入底部直径 21 cm、高 46 cm、水深 30 cm、水温 23~25 °C 的水中,观察 15 min。记录 4 类强迫游泳的行为:游泳、攀爬、潜水和不动。

1.2.3 胎鼠脑皮质形态学观察 分别取对照组和 PNE 组孕 20 d 胎鼠,剥离脑组织,恒冷箱(-20 °C)冠状切片,片厚 10 μm,4 °C 复温 8 min;冰冻切片置 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中 4 °C 固定 15 min;PBS 振荡清洗 2~

3 次,5 min/次;正常牛血清封闭 2 h;显示前额叶皮质及海马的断面切片给予 NeuN 小鼠抗大鼠单克隆抗体(1:100),4 °C 孵育过夜;PBS 振荡清洗 3 次;滴加羊抗小鼠 FITC(1:100),室温避光孵育 1 h;流水冲洗终止反应;50%甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.4 实时定量 PCR 成年子代大鼠海马和前额叶皮质提取后,加入 Trizol 和珠子匀浆和纯化,分光光度计检测浓度和纯度,cDNA 浓度定量为 1 μg/μL。随后逆转录并扩增。实时定量 PCR 的引物序列见表 1。目的基因的相对标准曲线在 PCR 仪(Corbett Research Pty Ltd., Sydney, Australia)上检测,并用 β-actin 行定量控制。PCR 条件:50 °C 2 min,95 °C 2 min,95 °C 15 s,退火温度 1 min,40 个循环。检测基因:β-肌动蛋白(β-actin)、突触蛋白(synapsin I, Syn I)、谷氨酸 NMDA 受体亚基 1 受体(ionotropic glutamate receptor 1, NR1)、谷氨酸 NMDA 受体亚基 2A 受体(ionotropic glutamate receptor 2A, NR2A)、谷氨酸 NMDA 受体亚基 2B 受体(ionotropic glutamate receptor 2B, NR2B)和突触囊泡相关蛋白 25(synaptosomal-associated protein-25, SNAP25)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件处理数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本均数 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料采用非参检验计;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成年仔鼠行为学变化

在旷场试验中,CUMS 前,PNE 组的总路程、中心路程、中心速率、粪便粒数和直立次数与对照组差异无统计学意义,见图 1。给予 CUMS 后,与对照组相比,PNE 组总路程明显减少,总速率明显下降(均 *P*<0.01),提示活动程度显著下降,出现部分抑郁样行为,见图 1A、B;直立次数减少(*P*<0.05),提示兴趣缺乏、探索欲和探索能力下降,见图 1F;粪便粒数增多(*P*<

表 1 实时定量 PCR 的引物序列表

基因	正向引物	反向引物
β-actin	GTTGCCAATAGTGATGACCT	GGACCTGACAGACTACCTCA
NR1	CAATAAGCGACACGGCTCTT	GCGGGTGGCTAACTAGGATA
NR2A	GATGACAACCACCTCAGCATT	CATCCCTTCGTTGGTTGAAT
NR2B	CAATGTCACTTTTGAAGGGAGA	TCCGAGGCCACACATAATACT
Syn I	TCAGCAGCACAACATACCCT	TGGACACGCACATCGTATTT
SNAP25	CTTTCCTTCCCTCCCTACC	GTTCCAGTTGTTCCGCTTG

0.05),提示出现焦虑、恐惧的抑郁症伴随症状,见图1E。与对照组相比,刺激后PNE的子代显示出明显的抑郁症合并焦虑的伴随症状,相同的刺激强度,PNE子代更容易出现抑郁症状,损害程度更重,对刺激更敏感。

强迫游泳试验中,CUMS前,PNE组子代不动时间即高于对照组($P<0.05$);CUMS后,PNE组子代不动时间显著长于对照组和同组刺激前($P<0.01$)。提示PNE组动物刺激前可能就出现抑郁气质,相同刺激下,抑郁程度更重更明显。游泳和攀爬时间在刺激前后2组差异无统计学意义($P>0.05$),提示大鼠的焦虑状态无明显差异。

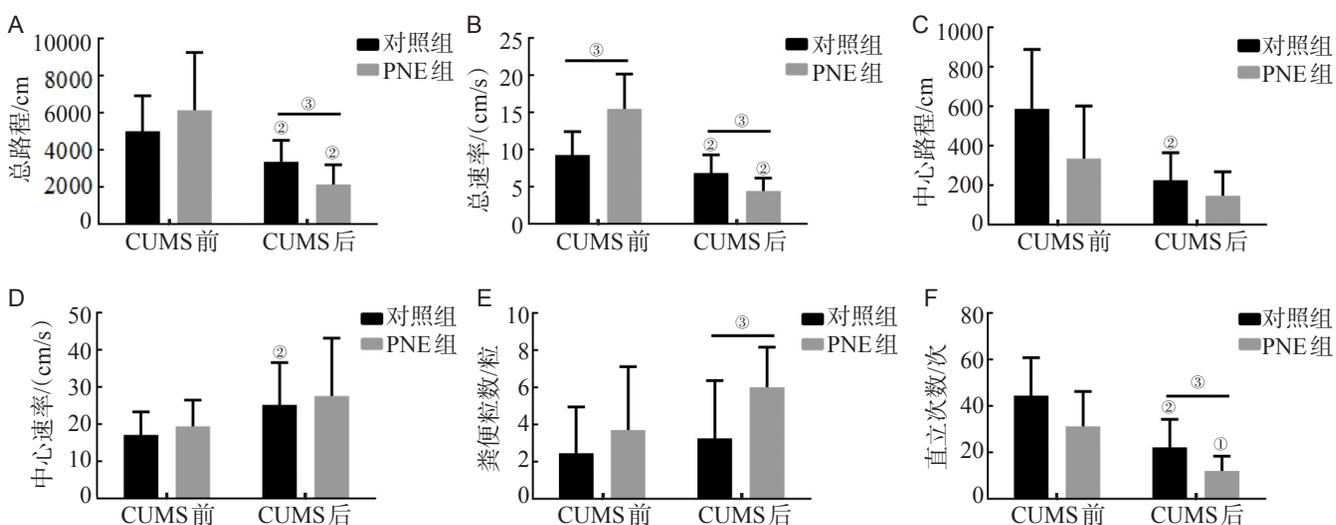
2.2 胎鼠脑皮质形态学改变

NeuN为成熟神经元的标志物。对照组胎鼠前额叶皮质和海马各锥体细胞层清晰可辨,结构完整,排列

整齐,部分细胞轴突显示完整、连续。PNE组胎鼠大脑前额叶皮质的总厚度与对照组相比明显减少,海马各锥体层结构分辨不清,细胞密度降低,排列松散,神经轴突显示模糊不清,断续不完整。PNE组前额叶皮质和海马区成熟神经元数量较对照组减少。提示PNE可能致子代前额叶皮质及海马神经元分化成熟障碍,降低成熟神经元含量,影响脑组织发育。

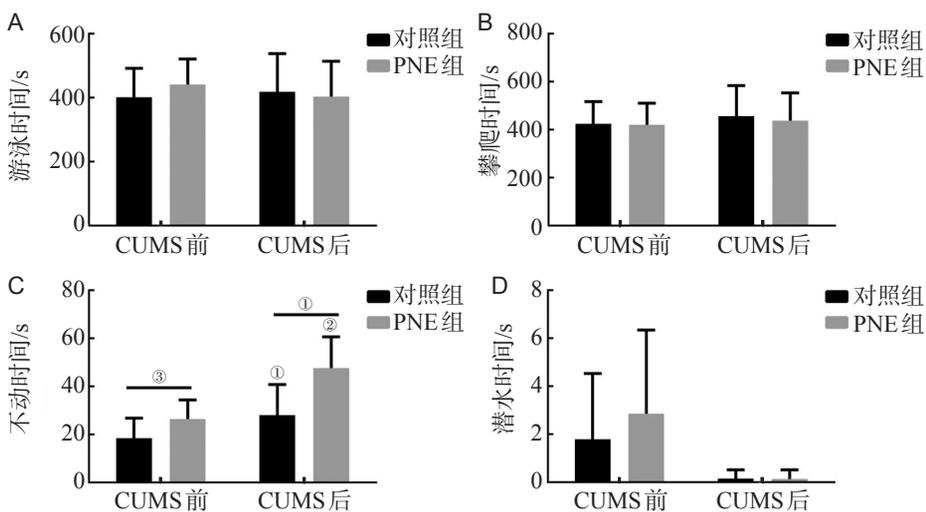
2.3 突触生长发育相关基因表达变化

雌性仔鼠正常喂养至成年,在CUMS刺激前,PNE组前额叶皮质和海马组织NR1、NR2A、NR2B和SynI mRNA转录水平和对照组差异无统计学意义($P>0.05$),Snap25 mRNA转录水平明显降低($P<0.01$)。CUMS刺激后,PNE组NR1、NR2A、NR2B、SynI和Snap25 mRNA转录水平较对照组显著降低($P<0.01$),见图4。提示CUMS后突触生长发育相关基因的表达



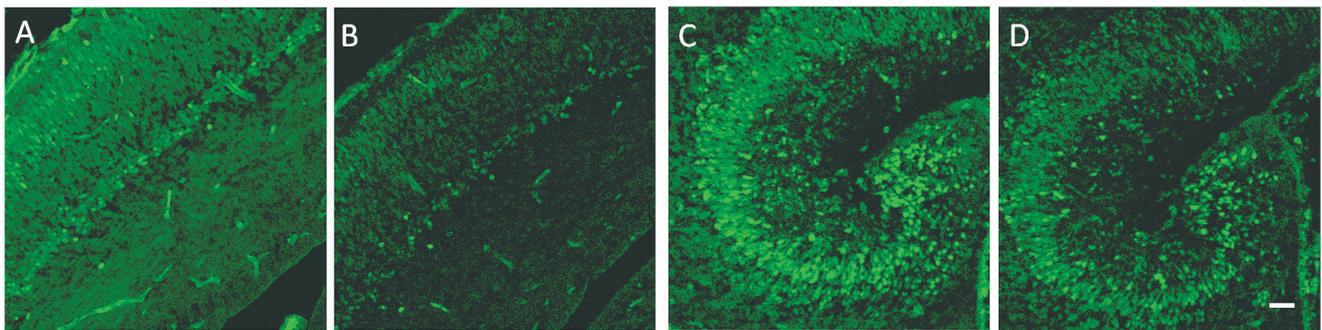
注:(A)总路程;(B)总速率;(C)中心路程;(D)中心速率;(E)粪便粒数;(F)直立次数;与同组CUMS前比较,^① $P<0.05$,^② $P<0.01$;与对照组比较,^③ $P<0.05$;对照组10只,PNE组10只

图1 2组成年雌性子代旷场试验结果比较



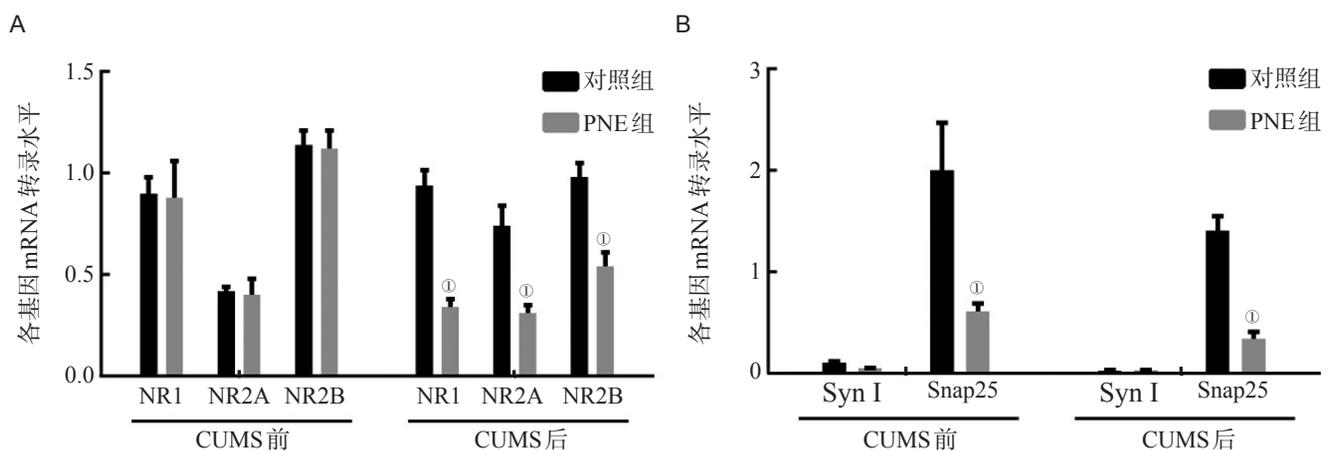
注:(A)游泳时间;(B)攀爬时间;(C)不动时间;(D)潜水时间;与同组CUMS前比较,^① $P<0.05$,^② $P<0.01$;与对照组比较,^③ $P<0.05$,^④ $P<0.01$;对照组10只,PNE组7只

图2 2组成年雌性子代强迫游泳实验结果比较



注:(A)对照组前额叶皮质;(B)PNE组前额叶皮质;(C)对照组海马组织;(D)PNE组海马组织;绿色荧光为NeuN染色,标尺=50 μm.

图3 孕20 d胎鼠脑组织免疫荧光染色



注:(A)突触形成和生长相关基因;(B)突触结构功能相关基因;与对照组比较,^① $P < 0.01$;对照组10只,PNE组7只

图4 2组前额叶皮质和海马区突触形成和功能相关基因转录水平比较

下降,在PNE组尤其明显。

3 讨论

抑郁症以显著而持久的情绪低落为主要临床特征,是心境障碍的主要类型,部分可有明显的焦虑和运动性激越。遗传、神经生化、神经内分泌与神经发生等因素与抑郁症的发病密切相关。流行病学研究表明,妊娠期母亲吸烟的子代中年后患抑郁症的风险比不吸烟者子代高1.83倍^[6]。孕期母亲吸烟使子代发生双相障碍的风险增加1.14~2倍^[7,8]。由此可见,抑郁症存在宫内发育起源,但机制不明。

本研究观察了PNE的子代行为学改变,发现PNE的子代雌性大鼠成年后在CUMS下出现抑郁症状;PNE的子代胎鼠前额叶皮质变薄,结构分辨不清,部分轴突断续不完整;并且PNE子代脑组织神经生长发育和突触形成、结构功能基因转录水平降低,这些改变可能与PNE导致子代抑郁症易感性增加有关。推测孕期尼古丁已经由母体通过胎盘对子代胎鼠脑组织造成一定影响,对出生后子代出现行为异常起到不可逆转的

作用。Bublitz等^[9]回顾性调查了孕期母亲吸烟与人类子代大脑结构和功能之间的关系,发现暴露于妊娠期烟草的胎儿在产后早期脑结构即有改变,包括小脑、侧脑室系统及额叶体积变小,儿童和青少年时期脑结构改变包括大脑皮质灰质体积减少,胼胝体体积减小,额叶、颞叶和顶叶区域变薄,提示尼古丁暴露对子代大脑具有不良影响。一项前瞻性研究发现母亲吸烟与胎儿脑部生长减少和皮质灰质体积减少有关,表明产前暴露于烟草可能影响皮质发育并表现为子代精神行为问题^[10]。以上研究与本实验观察到的胎鼠脑组织形态学改变结果相一致。

胎儿大脑在妊娠期间经历了大规模的生长、组织和连接,特别容易受到神经毒性物质的损害。尼古丁为脂溶性物质,可以透过胎盘屏障直接进入胎儿血液及脑组织。尼古丁与烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChRs)结合,广泛参与发育神经回路和神经递质系统的生长、连接和功能。尼古丁是神经递质乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)的外源性激动剂,能够结合并使这些nAChRs脱敏,从而模拟ACh

的作用。在胎儿、婴儿至青春期大脑发育成熟中ACh参与调节的过程可以被尼古丁扰乱。因此,不同成熟期的尼古丁暴露可引起不同的发育缺陷,尼古丁作为一种神经发育性毒物,可能对神经行为发育具有长期的影响^[1]。

N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体是离子型谷氨酸受体的一个亚型,在神经系统发育过程中参与调节神经元的存活,树突、轴突结构发育及参与突触可塑性的形成等。Syn I和Snap25均是参与突触结构维持、功能调节的重要蛋白。本研究对成年子代前额叶皮质和海马进行相关基因分析,发现刺激前PNE组Snap25的基因转录水平即降低,在刺激后NMDA受体的2个亚基NR1和NR2A、NR2B及Syn I和Snap25的基因转录水平均明显下降,推测这些基因通过影响神经元和突触的结构和功能参与子代抑郁症的发生,且可能是尼古丁暴露后从宫内起始的改变持续存在至成年后,经CUMS后转录下降更显著。最近研究认为,前额叶皮质的突触和轴突数量减少可能形成大脑区域功能受损的解剖学基础,在慢性应激下容易出现抑郁症^[12]。该研究佐证了本实验所观察到的现象和可能的机制。推测尼古丁通过与nAChRs结合,调节神经元存活、突触发生和成熟等相关基因表达导致子代脑前额叶皮质结构和功能改变,增加子代在应激状态下抑郁症发生的风险。

综上所述,本研究发现PNE的子代雌性大鼠成年后遭受应激容易出现抑郁行为,且受创程度更重,提示PNE导致子代出现抑郁症的易感性增加,可能与子代胎鼠前额叶皮质和海马发育受损并持续至成年,长期

影响神经生长和突触形成和功能有关。下一步研究将检测子代在胚胎发育期相关基因的表达和蛋白水平,以及关键因子的甲基化情况,为抑郁症的病因学研究提供可靠的实验依据。

参考文献

- [1] Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2008, 84: 30-44.
- [2] Kim KW, Won YL, Ko KS, et al. Smoking Habits and Neuropeptides: Adiponectin, Brain-derived Neurotrophic Factor, and Leptin Levels[J]. Toxicol Res, 2014, 30: 91-97.
- [3] Kim M, Han CH, Lee MY. NADPH oxidase and the cardiovascular toxicity associated with smoking[J]. Toxicol Res, 2014, 30: 149-157.
- [4] Talati A, Wickramaratne PJ, Wesselhoeft R, et al. Prenatal tobacco exposure, birthweight, and offspring psychopathology[J]. Psychiatry Res, 2017, 252: 346-352.
- [5] Ekblad M, Lehtonen L, Korkeila J, et al. Maternal Smoking During Pregnancy and the Risk of Psychiatric Morbidity in Singleton Sibling Pairs[J]. Nicotine Tob Res, 2017, 19: 597-604.
- [6] Elmasry H, Goodwin RD, Terry MB, et al. Early life exposure to cigarette smoke and depressive symptoms among women in midlife[J]. Nicotine Tob Res, 2014, 16: 1298-1306.
- [7] Chudal R, Brown AS, Gissler M, et al. Is maternal smoking during pregnancy associated with bipolar disorder in offspring? [J]. J Affect Disord, 2015, 171: 132-136.
- [8] Talati A, Bao Y, Kaufman J, et al. Maternal smoking during pregnancy and bipolar disorder in offspring[J]. Am J Psychiatry, 2013, 170: 1178-1185.
- [9] Bublitz MH, Stroud LR. Maternal smoking during pregnancy and offspring brain structure and function: review and agenda for future research[J]. Nicotine Tob Res, 2012, 14: 388-397.
- [10] Niemelä S, Sourander A, Surcel HM, et al. Prenatal Nicotine Exposure and Risk of Schizophrenia Among Offspring in a National Birth Cohort[J]. Am J Psychiatry, 2016, 173: 799-806.
- [11] King E, Campbell A, Belger A, et al. Prenatal Nicotine Exposure Disrupts Infant Neural Markers of Orienting[J]. Nicotine Tob Res, 2017, doi: 10.1093/ntr/ntx177.
- [12] Csabai D, Wiborg O, Czéh B. Reduced Synapse and Axon Numbers in the Prefrontal Cortex of Rats Subjected to a Chronic Stress Model for Depression[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 24.

(本文编辑:唐颖馨)