

卷烟烟气暴露对大鼠学习记忆功能及海马组织病理 和 BDNF 表达的影响

李跃¹, 潘秀颀², 杨陟华², 齐绍武^{1*}, 朱茂祥^{2*}

(1.湖南农业大学 农学院, 湖南 长沙 410128; 2.中国军事医学科学院 放射与辐射研究所, 北京 100850)

摘 要: 设对照组(未染毒)、低剂量组(约 2.5 支烟, 每天染毒 10 min)、中剂量组(约 5 支烟, 每天染毒 20 min)及高剂量组(约 10 支烟, 每天染毒 40 min)4 个处理, 将雄性 SD 大鼠置于气体染毒箱内行被动吸烟, 研究卷烟烟气暴露对大鼠学习记忆功能及海马病理和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的影响。结果表明: 染毒 30 d, 染毒组大鼠潜伏时间均显著短于对照组, BDNF 表达显著高于对照组; 染毒 60 d, 中剂量组大鼠潜伏时间显著短于对照组, BDNF 表达显著高于对照组; 染毒 180 d, 染毒组大鼠潜伏时间显著长于对照组, BDNF 表达显著高于对照组; 不同剂量处理大鼠的海马 HE 染色均无明显变化, 大鼠的海马组织均无器质性损伤; 短期烟气暴露可提高大鼠学习记忆功能, 随染毒时间的延长, 大鼠学习记忆功能下降, 该作用与海马 BDNF 的表达密切相关。

关 键 词: 大鼠; 卷烟烟气; 学习记忆; 海马组织; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R992 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)03-0310-04

Influence of cigarette smoke exposure on learning and memory function, histologic changes and brain-derived neurotrophic factor in rats

LI Yue¹, PAN Xiu-jie², YANG Zhi-hua², QI Shao-wu^{1*}, ZHU Mao-xiang^{2*}

(1.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Institute of Radiation Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: Male SD rats were randomly divided into normal control group and cigarette smoke group (CS group). Rats in CS group were exposed to cigarette smoke in ventilated smoking chambers and divided into low-dose group (about 2.5 cigarettes, exposed for 10 minutes a day), medium-dose group (about 5 cigarettes, exposed for 20 minutes a day) and high-dose group (about 10 cigarettes, exposed for 40 minutes a day). The influence of cigarette smoke exposure on learning and memory function of rats, on pathological changes of hippocampus and on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was explored by Morris water maze, H-E staining and immunohistochemistry staining, respectively. The results showed that the escape latency of CS group was significantly decreased and the expression of BDNF was significantly increased compared to normal control group 30 d after exposure; the escape latency of medium-dose group was shorter than that of the normal control group and the expression of BDNF of CS group was significantly increased 60 d after exposure; the escape latency of CS group was significantly increased and the expression of BDNF was significantly increased compared to normal control group 180 d after exposure. The hippocampus of rats in each group showed no significant change in H-E staining. The results showed that the function of learning and memory of rats was increased after short-term cigarette smoke exposure but decreased gradually with increased exposure time. This

收稿日期: 2012-02-03

项目基金: 中国烟草总公司科技项目(110200801022)

作者简介: 李跃(1987—), 男, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 主要从事烟草科学与工程技术研究, liyue90738@163.com; *通信作者, qishaowu2007@yahoo.cn; zhumx@nic.bmi.ac.cn

effect was closely related to the expression of BDNF in hippocampus.

Key words : rat; cigarette smoke; learning and memory; histologic; brain-derived neurotrophic factor(BDNF)

卷烟烟气危害是目前最严重的公共卫生问题之一。近年来,卷烟烟气对神经系统的影响越来越受到关注,但对卷烟烟气及其重要成分对神经系统影响的研究尚存在争议。李曼等^[1-2]认为,急性尼古丁暴露可促进大鼠大脑皮层和海马齿状回的神经元凋亡;慢性尼古丁暴露可降低GABA(B1)受体在大鼠海马组织中的表达^[3],降低海马组织中乙酰胆碱-3(HC-3)含量^[4];烟气暴露更可致胎儿发育迟缓^[5]、后代动物学习记忆能力降低^[6]、小脑皮质神经生长因子含量下降以及海马神经元突触可塑性的受损。另有研究^[7-8]表明,尼古丁可增加原代培养的PC12细胞胆碱能神经元的高亲和力,增加神经生长因子受体(TrkA)的表达,对神经细胞起保护作用;尼古丁预处理PD小鼠的行为障碍明显减轻^[9]。笔者研究不同浓度卷烟烟气及染毒时间对大鼠学习记忆能力、海马区病理及BDNF表达的影响,以期对卷烟危害的正确评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与主要仪器设备

雄性SD大鼠(140~180 g)购于中国军事医学科学院动物中心;市售普通卷烟;BDNF抗体购于英国Abcam公司。

主要仪器设备:特制烟气暴露染毒柜由中国军事医学科学院自主研发^[10];尼康80I光学显微镜;Morris水迷宫系统。

1.2 试验设计

将120只大鼠按染毒时间(30、60、180 d)随机分为3大组,每组40只;每组设对照组(未染毒)、低剂量组(约2.5支烟,每天染毒10 min)、中剂量组(约5支烟,每天染毒20 min)及高剂量组(约10支烟,每天染毒40 min)4个处理,每处理10只大鼠。将染毒组于每天9:00置于染毒柜染毒,保持染毒柜温度为(22±2)℃,相对湿度(21±0.5)%,氧气

体积分数(21±0.5)%,压力(101 325±40) Pa。于染毒30、60、180 d分别对大鼠进行学习记忆功能测试,苏木素-伊红(HE)染色及免疫组化观察BDNF的变化。

1.3 大鼠学习记忆功能检测

采用Morris水迷宫法对大鼠学习记忆功能进行检测。水迷宫直径为140 cm,保持水深30 cm,水温(25±1)℃,平台基本与水面齐平。于卷烟烟气暴露的30、60、180 d对各组大鼠进行前期水迷宫训练:从4个象限固定点将大鼠面向池壁放入水中自由游泳1 min,大鼠找到平台后让其在平台上停留20 s;没有找到平台,将其引导至平台停留20 s。每天1次。2 d后开始记录迷宫成绩,记录大鼠从4个象限固定入水点入水后寻找并爬上平台所需的时间,即逃避潜伏期(潜伏时间越长,表明大鼠的学习记忆功能越弱)。若没有找到平台记为60 s。所有大鼠每天测试1次,分别记录由各个象限投入后的潜伏时间,共测试5 d,每只大鼠共记录20次成绩。

1.4 大鼠海马组织病理学观察

学习记忆功能测试结束后,对所有大鼠采用心脏灌流法内部去血固定;取大脑组织,固定12 h后石蜡包埋后冠状切片,切片部位均为大脑海马组织,所有样品切片方向保持一致。取5张切片进行HE染色,观察海马组织的病理改变。每只大鼠观察3张切片。

1.5 海马免疫组化试验检测BDNF的表达

取石蜡切片5张,采用ABC免疫酶染色法^[11]对大鼠海马组织切片进行免疫组化染色。每张切片高倍(×400)镜下计数海马区5个视野阳性细胞总数及总细胞数,计算每个视野平均阳性细胞率(阳性细胞率=阳性细胞数/总细胞数×%)。每只大鼠计数3张切片。

1.6 数据处理

采用Excel 2003进行数据处理;采用SPSS 16.0进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 卷烟烟气暴露对大鼠学习记忆功能的影响

由表1可知,随生长时间的延长,对照组潜伏时间逐渐变短,说明大鼠学习记忆能力增强。染毒30 d,染毒组潜伏时间均显著短于对照组,其中低剂量组潜伏时间最短,但中、高剂量组差异不显著;染毒60 d,中剂量组潜伏时间显著短于对照组及低、高剂量组;染毒180 d,各剂量组潜伏时间均显著长

表1 不同处理大鼠Morris水迷宫潜伏时间

组别	潜伏时间/s		
	30 d	60 d	180 d
对照组	(42.328±5.398)a	(36.529±5.606)a	(23.757±4.696)c
低剂量组	(30.942±5.253)c	(34.758±5.339)a	(30.592±6.248)ab
中剂量组	(34.071±5308)b	(26.160±4874)b	(27.154±5342)b
高剂量组	(35.793±5.324)b	(35.424±5.997)a	(35.443±5.725)a

于对照组,中剂量组潜伏时间显著短于高剂量组。结果表明,卷烟烟气暴露短时间内对大鼠学习记忆有促进作用,随染毒时间的延长,高剂量烟气对大鼠学习记忆产生明显不良影响,对神经发育具有损伤作用;低剂量烟气对大鼠学习记忆的刺激减退较早,而中剂量对学习记忆的刺激减退较晚,表明这种刺激作用具有饱和的特性。

2.2 供试大鼠海马组织形态学的变化

HE染色结果(图1)显示,对照组大鼠海马神经元呈圆形或椭圆形,排列整齐、紧密,染色较均一,细胞核仁清晰;随生长时间的延长,海马组织病理HE染色无明显改变。与对照组相比,不同染毒时间下大鼠的海马组织HE染色均无明显改变,表明在本试验剂量和染毒时间下大鼠的海马组织均无器质性损伤。

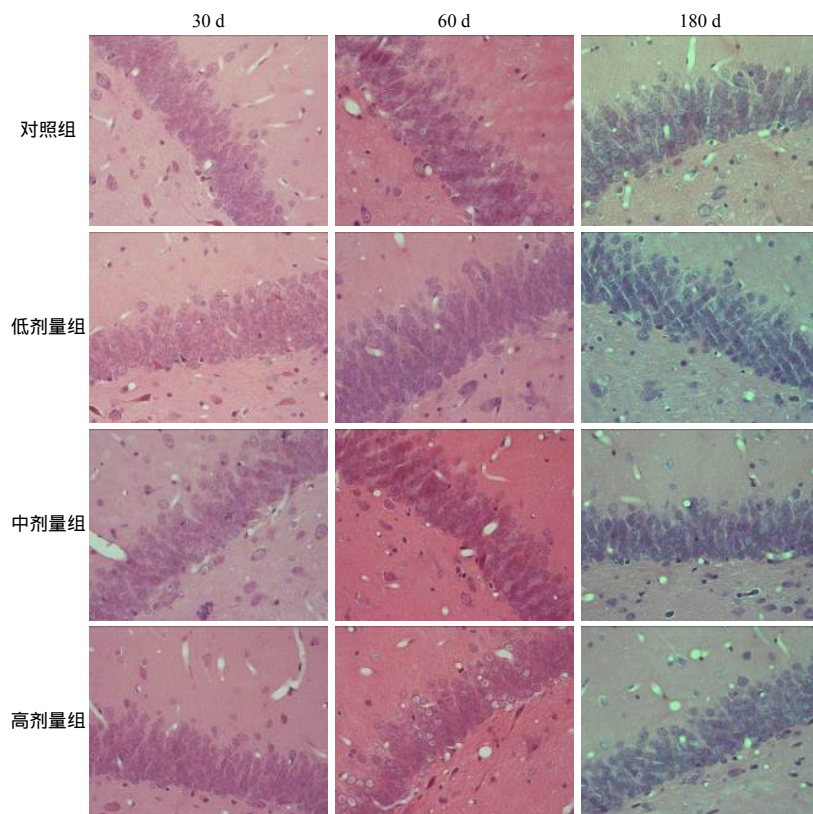


图1 不同染毒时间及浓度下大鼠海马组织的形态($\times 400$)

Fig.1 Influence of cigarette smoke exposure on histologic changes in rats ($\times 400$)

2.3 大鼠海马组织 CA1 区 BDNF 表达的变化

从封二图1可以看出,对照组大鼠海马组织区部分细胞有BDNF的表达,主要分布于胞浆中;染毒后大鼠海马组织BDNF染色均明显增加,染毒组

BDNF的表达高于对照组,且随时间及烟气浓度的变化而变化,染毒30 d低剂量组表达高于其他各组;染毒60 d和180 d,中剂量组表达高于其他各组。

由表2可知,染毒30 d,染毒组大鼠BDNF阳性细胞率均显著高于对照组,低剂量组BDNF表达显

著高于中、高剂量组；染毒60 d，染毒组大鼠BDNF表达显著高于对照组，中剂量组BDNF的表达显著高于低、高剂量组；染毒180 d，染毒组显著高于对照组，中剂量组显著高于低、高剂量组。不同染毒剂量染毒30 d的水迷宫测定结果与BDNF表达变化具有相同趋势；染毒60、180 d的测定结果中，染毒组测定结果与水迷宫测定结果仍具有相同变化趋势，但与对照组的变化趋势不明显，表明BDNF的表达是影响大鼠学习记忆功能的因素之一。

表2 不同处理下大鼠海马CA1区BDNF阳性细胞率

Table 2 BDNF-positive cell rate in rat hippocampal CA1 region after cigarette smoke exposure

组别	阳性细胞率/%		
	30 d	60 d	180 d
对照组	(41±6)d	(44±6)c	(44±5)c
低剂量组	(57±8)a	(51±5)b	(52±3)b
中剂量组	(53±7)b	(56±5)a	(56±5)a
高剂量组	(48±5)c	(51±4)b	(52±7)b

3 结论与讨论

本研究结果表明，卷烟烟气暴露对大鼠学习记忆功能所产生的影响并非单一的。染毒处理大鼠学习记忆功能呈现前期提高而后随时间延长降低的趋势；染毒30 d，大鼠的学习记忆能力均好于对照组；染毒60 d和180 d，大鼠的学习记忆功能降低，且中剂量组的大鼠学习记忆功能优于低、高剂量组。从染毒剂量及时相分析，笔者认为卷烟烟气暴露对大鼠学习记忆既具有促进作用，同时存在损伤作用，这可能是烟气中的重要成分(如尼古丁)直接作用的结果。短时间染毒，促进学习记忆的功能表现明显，而随染毒时间的延长，高剂量烟气染毒对学习记忆产生明显损伤，表明高剂量烟气暴露具有损伤神经发育的作用；低剂量烟气对学习记忆的刺激减退较早，而中剂量烟气对学习记忆的刺激减退较晚，表明这种刺激作用具有饱和的特性。

BDNF是在脑内合成的一种蛋白质，它广泛分布于中枢神经系统，在中枢神经系统发育过程中对神经元的存活、分化、生长发育起重要作用^[12]。神经营养因子在胚胎生长发育期表达水平高，随机体发育成熟水平降低至平缓。本研究结果表明，不同剂量烟气染毒的大鼠海马组织的BDNF表达与学习记忆功能测定结果变化趋势相似，染毒后大鼠海马组织的BDNF表达均增加，而在染毒组内学习记忆

功能的高低与BDNF的表达量相一致。笔者认为烟气染毒对学习记忆的促进作用可能是通过BDNF产生影响。有关卷烟烟气是通过尼古丁激活受体导致BDNF的增加还是卷烟烟气其他成分对BDNF表达的直接影响，以及卷烟烟气对学习记忆损伤的机制等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李曼, 翟秀岩. 急性暴露尼古丁对未成年大鼠脑内神经元Caspase-3表达及凋亡的影响[J]. 解剖学报, 2006, 37(5): 504-508.
- [2] 李曼, 翟秀岩. 急性暴露尼古丁对1月龄大鼠丘脑腹后内侧核内Caspase-3表达及凋亡的影响[J]. 解剖学进展, 2006, 12(2): 121-123.
- [3] Li S P, Park M S, Kim J H, et al. Chronic nicotine and smoke treatment modulate dopaminergic activities in ventral tegmental area and nucleus accumbens and the gamma-aminobutyric acid type B receptor expression of the rat prefrontal cortex[J]. J Neurosci Res, 2004, 78(6): 868-879.
- [4] Trauth J A, Mccook E C, Seidler F J, et al. Modeling adolescent nicotine exposure: Effects on cholinergic systems in rat brain regions[J]. Brain Res, 2000, 873(1): 18-25.
- [5] Younoszai M K, Peloso J H J C. Fetal growth retardation in rats exposed to cigarette smoke during pregnancy [J]. Am J Obstet Gynecol, 1969, 104: 1207-1213.
- [6] Larroque B. Prenatal exposure to tobacco smoke and cognitive development: Epidemiology studies[J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod(Paris), 2003, 32: 123-129.
- [7] Jonnala R R, Terry Jr, Buccafusco J J. Nicotine increases the expression of high affinity nerve growth factor receptors in both *in vitro* and *in vivo*[J]. Life Sci, 2002, 70 (13): 1543-1554.
- [8] Martinez R R, Toledano A, Alvarez Mi, et al. Chronic nicotine administration in creases NGF-like immunoreactivity in frontoparietal cere-bral corten[J]. J Neurosci Res, 2003, 73(5): 708-716.
- [9] 殷剑, 仲林, 邹敬宇, 等. 尼古丁对Parkinson小鼠黑质多巴胺能神经元及小胶质细胞的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2006, 22(3): 307-311.
- [10] 刘永, 胡旺顺, 齐绍武, 等. 亚慢性和长期主流烟气暴露小鼠血清乳酸脱氢酶和 α -羟丁酸脱氢酶活力的变化研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(4): 55-57.
- [11] 段丽晖, 周国庆, 孙芳, 等. β -淀粉样蛋白对大鼠学习记忆、病理及tau蛋白磷酸化的影响[J]. 东南国防医药, 2009, 11(5): 389-393.
- [12] Mertz K, Koscheck T, Schilling K. Brain-derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells: an *in vitro* study[J]. Neuroscience, 2000, 97(2): 303-310.

责任编辑: 杨盛强