

俞发荣,李建军,连秀珍,等. 精神依赖物海洛因对大鼠胚胎发育和脑组织 Bax 表达的影响[J].中国实验动物学报, 2019,27(4):527 - 531.

Yu FR,Li JJ,Lian XZ, et al. Effects of heroin on embryonic development and Bax expression in embryonic rat brain tissue [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):527 - 531.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2019. 04. 016

精神依赖物海洛因对大鼠胚胎发育和脑组织 Bax 表达的影响

俞发荣,李建军,连秀珍,李登楼,谢明仁*

(甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室(甘肃政法大学),兰州 730070)

【摘要】 目的 探讨精神依赖物海洛因对胚胎大鼠发育和大脑 Bax 表达的影响。**方法** 将受孕后的 Wistar 大鼠随机分为对照组和海洛因给药组(分为海洛因低、中、高剂量组)。第7天,分别给予16、32和64 mg/kg 的海洛因,连续给予海洛因9 d,观察精神依赖物海洛因对胚胎大鼠形态结构发育的影响,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测胚胎大脑组织 Bax 表达水平。**结果** 胚胎观察发现,海洛因低、中、高剂量组活胚胎总数比对照组分别减少了27.27%、37.12%和48.48%;海洛因低剂量组胚胎枕骨发育不全,胚胎出现脑膨出畸形;海洛因中剂量组胚胎枕骨、顶骨发育不全,胚胎脑膨出明显;海洛因高剂量组胚胎枕骨、顶骨、颞骨发育不全,胚胎脑膨出更为明显。ELISA 检测发现,海洛因低、中、高剂量组胚胎大脑组织中 Bax 表达水平比对照组分别增加了11.41%、47.06%、83.74%,差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$);胚胎小脑组织中 Bax 表达水平比对照组增加了17.16%、52.96%和90.01%,差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 精神依赖物海洛因具有明显抑制胚胎大鼠形态结构发育的作用,抑制作用随给予海洛因剂量的增加而增强,其作用机制可能与海洛因诱导胚胎组织器官 Bax 表达上调有关。

【关键词】 海洛因;胚胎发育;Bax 表达;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0527-05

Effects of heroin on embryonic development and Bax expression in embryonic rat brain tissue

YU Farong, LI Jianjun, LIAN Xiuzhen, LI Denglou, XIE Mingren*

(Gansu University of Political Science and Law, Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application, Lanzhou 730070, China)

Corresponding author: XIE Mingren. E-mail: xmr6700@gsli.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of heroin on the development and brain Bax expression in embryonic rat brain tissues. **Methods** Wistar rats were randomly divided into a control group or heroin administration groups (low, medium, and high dose groups). On the 7th day, 16, 32, and 64 mg/kg of heroin were administered to the low, medium, and high dose groups, respectively, and heroin was continuously administered for 9 days. The effects of heroin on morphological development of embryonic rats were measured, and the expression levels of Bax in embryonic brain tissues was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The total numbers of living embryos in the

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(17JR5RA158);甘肃省高校科技创新团队项目(2016C-09);兰州市科技计划项目(2015-3-80);兰州市人才创新创业项目(2016-RC-85);西北民族地区侦查理论与实务研究中心项目。

Funded by Gansu Natural Science Foundation Project (17JR5RA158), Gansu University Science and Technology Innovation Team Project (2016C-09), Lanzhou City Science and Technology Plan Project (2015-3-80), Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (2016-RC-85), and Northwest Ethnic Region Detection Theory and Practice Research Center Funding.

[作者简介] 俞发荣(1959—)男,研究员,博士,硕士生导师。研究方向:法医毒物毒理学及实验动物学。Email: tim9898@163.com

[通信作者] 谢明仁(1977—),男,副教授,硕士生导师。研究方向:证据科学技术。Email: Xmr6700@gsli.edu.cn

low, medium, and high dose heroin groups were decreased by 27.27%, 37.12%, and 48.48%, respectively, compared with the control group ($P < 0.01$). Bax expression levels in embryonic cerebral tissues of the low, medium, and high dose heroin groups were increased by 11.41%, 47.06%, and 83.74%, respectively, compared with the control group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). Bax expression levels in the embryonic cerebellar tissue were increased by 17.16%, 52.96%, and 90.01%, respectively, compared with the control group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). **Conclusions** Heroin inhibits morphological development in embryonic rats, and this inhibitory effect increases with increasing doses of heroin. This effect may be caused by the heroin-induced upregulation of Bax expression in embryonic tissues and organs.

【Keywords】 heroin; embryonic development; Bax expression; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

统计结果表明,精神依赖物海洛因滥用是目前滥用最严重,危害最大的毒品之一^[1]。近年来,在精神依赖物海洛因滥用的人群中,女性滥用人数明显上升^[2],其中育龄妇女约占 1/5~1/3。动物实验结果表明,精神依赖物海洛因在引起母体损伤^[3]的同时,可迅速通过胎盘屏障和胚胎血-脑脊液屏障,对胎儿产生毒性作用^[4]。孕妇吸毒 1 h 后,在胎儿体内测出有海洛因代谢产物吗啡存在。海洛因可直接作用于胚胎发育的各个时期,导致胚胎组织器官发育不全或畸形^[5]。前期研究发现,海洛因成瘾大鼠中脑腹侧被盖区(VAT) Bax 基因表达水平明显升高^[6]。刘学红等^[7]应用免疫组织化学法研究发现,在人胚胎舌上皮组织细胞中均有 Bax 蛋白阳性表达,说明 Bax 基因参与调控人胚胎组织细胞的分化发育。Bax 基因属于 Bcl-2 基因家族,Bax 基因表达不仅拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡作用,而且具有促进细胞凋亡的功能。若 Bax 基因表达异常,将导致胚胎组织器官发育畸形^[8]。本文在前期研究的基础上,以 Wistar 大鼠为实验对象,建立海洛因孕鼠模型,在大鼠胚胎发育期给予不同剂量的海洛因,观察海洛因对胚胎发育及脑组织中 Bax 表达的影响,为研究精神依赖物海洛因的遗传毒性机制积累参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 90 只(雌 60 只,雄 30 只),体重 200~210 g,来源于甘肃中医药大学科研实验中心【SCXK(甘)2015-0001】。实验在甘肃政法大学 SPF 级动物实验室进行【SYXK(甘)2015-0006】。实验按 3R 原则给予实验动物人文关怀。伦理委员会审批号:GZF-2019-002。

1.1.2 试剂与仪器

海洛因,含量 86.8%,兰州市公安局提供;Bax

ELISA kit,上海将来实业股份有限公司提供;酶标仪, Thermo MK3 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠分组、给药

全部大鼠在 SPF 级实验室 IVC 饲养盒饲养 7 d,雌:雄按 2:1 合笼饲养。合笼第 2 天用光学显微镜观察阴道拭子涂片,有精子者视为交配“受孕”。将“孕鼠”随机分为:①对照组,10 只孕鼠,肌肉注射生理盐水 2 mL/(kg·bw);②海洛因组高剂量组,肌肉注射海洛因 64 mg/(kg·bw);③海洛因中剂量组,肌肉注射海洛因 32 mg/(kg·bw);④海洛因低剂量组,肌肉注射海洛因 16 mg/(kg·bw),每组 10 只孕鼠。各组均从受孕第 7 天开始给药,连续给药 9 d。

1.2.2 胚胎子鼠发育观察

受孕第 20 天,乙醚麻醉孕鼠,无痛解剖开腹部,全切取子宫检查吸收胎、死胎及活胎数,并对胎鼠进行体表形态检查。

1.2.3 胚胎子鼠脑组织 Bax 水平检测

剥取各组胚胎子鼠大脑额叶皮质和小脑皮层,各称取 500 mg,用匀浆研磨器研磨,离心机 2000 r/min,离心 15 min,取上清,用 ELISA 法检测 Bax 水平。

1.2.4 标准曲线和标准曲线的直线回归方程制作

以 Bax 标准品浓度为横坐标,吸光度(OD)为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。

1.3 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析。组间用单因素方差分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,海洛因对胚胎脑组织 Bax 水平的影响程度用%表示, $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

2.1 海洛因对大鼠胚胎发育的影响

受孕第 20 天,解剖开腹部,全切取子宫检查胚胎数、死胎及活胎数。结果发现,海洛因高、中、低

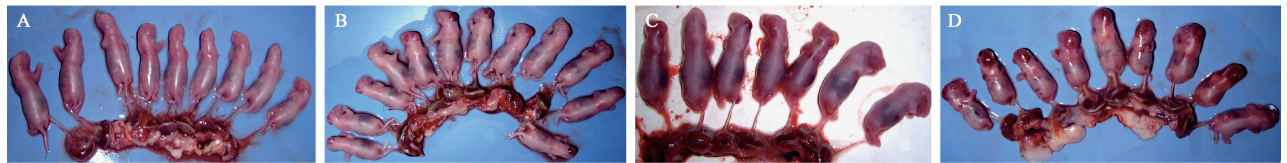
剂量组活胚胎总数比对照组减少了 48.48%、37.12%和 27.27%。(表 1)

活体检查看出,海洛因低剂量组胚胎枕骨发育不全,胚胎出现脑膨出畸形;海洛因中剂量组胚胎枕骨、顶骨发育不全,胚胎脑膨出明显;海洛因高剂量组胚胎枕骨、顶骨、颞骨发育不全,胚胎脑膨出更为明显,部分胚胎出现四肢及指骨发育不全。(图 1)

表 1 海洛因对大鼠胚胎发育的影响

Table 1 Effect of heroin on the embryonic development of rats

	对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
受孕大鼠总数 Total number of pregnant rats	10	10	10	10
胚胎总数 Total number of embryos	132	126	128	124
活胚胎总数 Total number of live embryos	132	96	83	68
活胚胎率% Viable embryo rate%	100	76.19	64.84	54.84
未发育胚胎数 Number of undeveloped embryos	0	30	45	56
畸形胚胎总数 Total number of malformed embryos	0	32	46	54



注 A:对照组胚胎。B:海洛因低剂量组胚胎:枕骨发育不全,胚胎出现脑膨出畸形。C:海洛因中剂量组胚胎:枕骨、顶骨发育不全,胚胎脑膨出明显。D:海洛因高剂量组胚胎:枕骨、顶骨、颞骨发育不全,胚胎脑膨出更为明显。

图 1 海洛因对大鼠胚胎发育的影响

Note. A, Embryos in the control group. B, Occipital bone hypoplasia, embryonic encephalocele deformity in the low dose heroin group. C, Embryos in the medium-dose heroin group; occipital and parietal bone hypoplasia, obvious embryonic encephalocele. D, Embryos in the high-dose heroin group; occipital, parietal and temporal bone hypoplasia, and more obvious embryonal encephalocele.

Figure 1 Effect of heroin on embryonic development of the rats

2.2 海洛因对胚胎子鼠大脑额叶皮层 Bax 表达水平的影响

以 Bax 标准液浓度为横坐标,吸光度(OD)为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。(图 2)

将胚胎子鼠大脑额叶皮层 OD 代入直线回归方程,海洛因低、中、高剂量组胚胎子鼠大脑额叶皮层中 Bax 水平比对照组增加了 11.41%、47.06%和 83.74%($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(图 3)

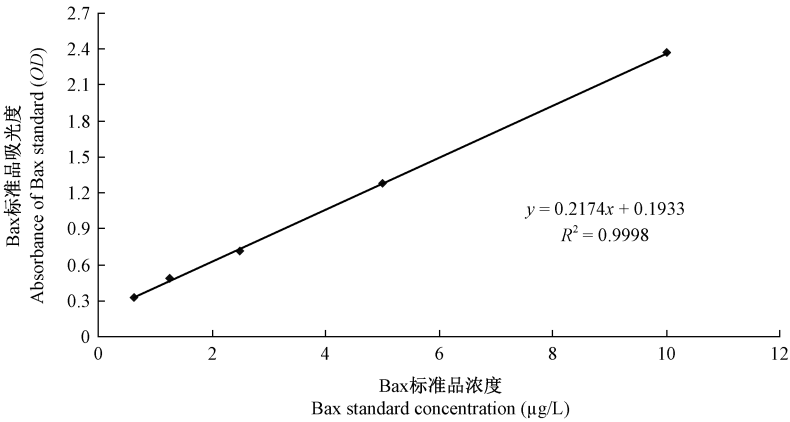
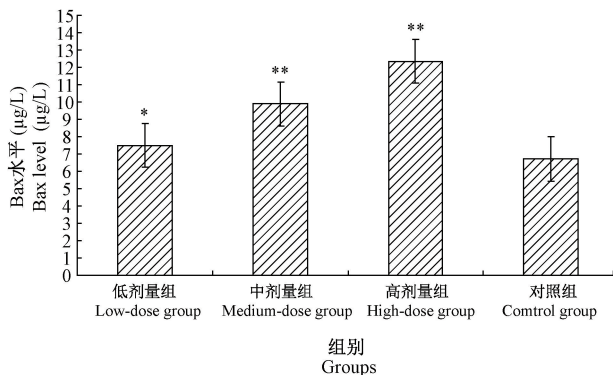


图 2 Bax 标准曲线和标准曲线的直线回归方程

Figure 2 Bax standard curve and linear regression equation of the standard curve

2.3 海洛因对胚胎子鼠小脑组织 Bax 表达水平的影响

将小脑组织 OD 代入上述 Bax 直线回归方程,海洛因低、中、高剂量组胚胎小脑组织中 Bax 表达水平比对照组增加了 17.16%、52.96% 和 90.01% ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(图 4)



注:与对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下图同。

图 3 海洛因对胚胎子鼠大脑额叶皮层 Bax 表达水平的影响
Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of heroin on Bax expression level in the rat embryonic brain tissue

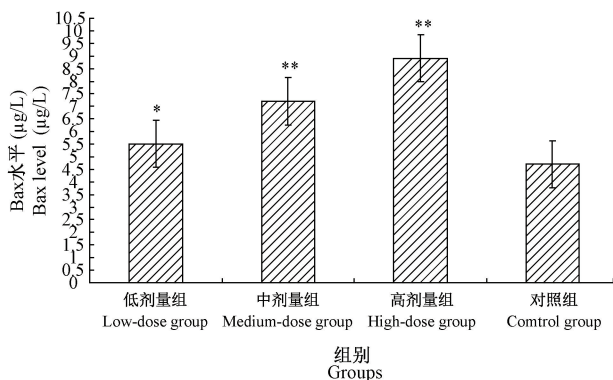


图 4 海洛因对胚胎子鼠小脑组织 Bax 表达水平的影响

Figure 4 Effects of heroin on Bax expression level in the rat embryonic cerebellar tissue

3 讨论

近年研究表明,精神依赖物海洛因滥用严重影响母体健康^[9],直接损害脑组织神经元^[10]、星形胶质细胞^[11]、颗粒细胞^[12]和免疫系统^[13],使血-脑脊液屏障的通透性发生改变,从而诱导大脑损伤和脑功能异常^[14],引起周围神经损伤^[15],导致神经发生退行性病变^[16]。王园园等^[17]报道,孕妇滥用海洛因将影响胚胎大脑正常发育,影响子代的学习记忆

能力^[18]。李重阳等^[19]给小鼠仔鼠注射海洛因 20 d,仔鼠下丘脑和海马凋亡细胞及 Bax 蛋白阳性表达细胞的数明显高于对照组,并随着海洛因剂量的递增阳性表达细胞的数量呈增多趋势。许梓枫等^[20]报道,海洛因滥用不仅影响胚胎正常发育,出现宫内死胎、流产、早产,增加新生儿及婴儿死亡的概率,还使子代表观遗传性发生改变^[21]。胚胎解剖发现,给予孕鼠海洛因后,活胎率明显降低,胚胎表型发育受到干扰。由于胚胎颅骨发育受到干扰,脑膨出畸形胚胎数显著增加,实验结果与许梓枫等报道结果相一致。ELISA 法检测发现,胚胎大脑组织细胞 Bax 表达水平随给予海洛因剂量的增加而升高。结果提示,Bax 基因是促进细胞凋亡的主要基因,Bax 基因表达的蛋白可能抑制胚胎发育和组织器官的形成,或破坏胚胎新形成组织器官,出现畸形胚胎或死胎。海洛因通过母体干扰胚胎表型和组织器官的发育,诱导胚胎组织细胞 Bax 基因表达的分子生物学机制有待进一步实验研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 杨黎华,任周阳.阿片类物质依赖治疗综述[J].云南警官学院学报,2018,(1):24-27.
Yang LH, Ren ZY. A review of opioids dependence therapy [J]. J Yunnan Police College, 2018, (1): 24-27.
- [2] Kovatsi L, Fragou D, Samanidou V, et al. Drugs of abuse: epigenetic mechanisms in toxicity and addiction [J]. Cur Med Chem, 2011, 18 (12): 1765-1774.
- [3] 俞诗源,王悦,郭婷婷,等.海洛因对母鼠体重、行为及肺中相关活性物质表达的影响[J].西北师范大学学报(自然科学版),2010,46(2):94-100.
Yu SY, Wang Y, Guo TT, et al. Effects of heroin on weight, behaviour and expression of related interrelated polypeptide in the lungs of female rats [J]. J Nort Norm Univ (Nat Sci), 2010, 46 (2): 94-100.
- [4] 王昱,李重阳,俞诗源,等.孕小鼠注射海洛因对仔鼠大脑额叶皮层结构及 ADA、SDH、NOS、GSH 活性的影响[J].解剖学报,2009,40(2):175-182.
Wang Y, Li CY, Yu SY, et al. Effects on the structure of cerebral temporal lobe cortex and activities of ADA, SDH, NOS and GSH of filial mice after injecting heroin in pregnant mice [J]. Acta Anat Sin, 2009, 40(2):175-182.
- [5] 潘波,黄绍强.阿片类镇痛药对发育期大脑神经毒性作用的研究进展[J].复旦学报(医学版),2015,42(5):670-674.
Pan Bo, Huang SQ. The neurotoxicity effect of opioids on developing brain: articles review [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2015,42(5):670-674.
- [6] 俞发荣,连秀珍,谢明仁,等.海洛因成瘾模型建立及中脑腹侧盖区 Bax 的表达[J].中国实验动物学报,2012,20(6):82-84.

- Yu FR, Lian XZ, Xie MR, et al. Effect of heroin on Bax expression in the brain ventral tegmental area and establishment of a rat model of heroin addiction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20 (6): 82-84.
- [7] 刘学红, 张泳. 增殖性细胞核抗原、c-fos 和 Bax 蛋白在人胚胎舌组织中的表达 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2013, 42 (5): 517-522.
- Liu XH, Zhang Y. Expression of PCNA c-fos and Bax proteins in human embryonic tongue tissues [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2013, 42(5): 517-522.
- [8] 张海兰, 安东, 唐晓冰, 等. Bcl-2 和 Bax 基因在肛门直肠畸形胎鼠泄殖腔胚胎发育中的表达 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(5): 399-401, 405.
- Zhang HL, An D, Tang XB, et al. Gene expression patterns of Bcl-2 and Bax during the cloacal embryonic development of anorectal malformation [J]. J Chin Med Univ, 2013, 42(5): 399-401, 405.
- [9] 刘柳, 段慧娟. 中国女性吸毒者的群体异同研究 [J]. 江苏社会科学, 2017, (4): 57-65.
- Liu L, Duan HJ. Study on the similarities and differences of female drug users in China [J]. Jiangsu Soc Sci, 2017, (4): 57-65.
- [10] Quick SL, Pyszczyński AD, Colston KA, et al. Loss of alternative non-drug reinforcement induces relapse of cocaine-seeking in rats; role of dopamine D1 receptors [J]. Neuropsychopharmacology, 2011, 36: 1015-1020.
- [11] 乐凯, 文若剑. 阿片成瘾中的神经免疫机制 [J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2017, 45(3): 241-246.
- Le K, Wen RJ. Neuroimmune mechanism of opiates addiction [J]. J Jiangnan Univ (Nat Sci Edit), 2017, 45(3): 241-246.
- [12] 胡夏韵, 苏天园, 刘丽, 等. C-Jun 和 Bcl-2 在海洛因所致大鼠小脑颗粒细胞凋亡中的作用 [J]. 新疆医科大学学报, 2017, 49(12): 1549-1554.
- Hu XY, Su TY, Liu L, et al. Effects of c-Jun and Bcl-2 in diacetylmorphine-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells [J]. J Xinjiang Med Univ, 2017, 49(12): 1549-1554.
- [13] 阳初玉, 李飞, 陈万. 浅谈海洛因对海洛因成瘾者神经系统和免疫系统功能的影响 [J]. 当代医药论丛, 2017, 15(18): 170-171.
- Yang CY, Li F, Chen W. Effects of heroin on nervous system and immune system of heroin addicts [J]. Contempor Med Forum, 2017, 15(18): 170-171.
- [14] 张浩林, 王学伟, 崔彩莲. 阿片类物质对成体神经发生的影响 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2015, 24(3): 87-92.
- Zhang HL, Wang XW, Cui CL. Effects of opioids on adult neurogenesis [J]. Chin J Drug Dep, 2015, 24(3): 87-92.
- [15] 雷俊杰, 刘汉伟, 莫志怀, 等. 选择性累及脊髓前角的海洛因中毒性脊髓病 1 例 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 43(9): 559-561.
- Lei JJ, Liu HW, Mo ZH, et al. A case of heroin toxic myelopathy involving the anterior horn of the spinal cord [J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2017, 43(9): 559-561.
- [16] 张朋, 徐星, 毛紫娟, 等. MicroRNAs 在甲基苯丙胺滥用诱导神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2017, 26(6): 411-417.
- Zhang P, Xu X, Mao ZJ, et al. Progress of microRNAs in the study of neurodegenerative diseases induced by methamphetamine abuse [J]. Chin J Drug Dep, 2017, 26(6): 411-417.
- [17] 王园园, 王冬梅, 隋南. 胚胎期可卡因、吗啡暴露影响子代成瘾相关行为的神经发育机制 [J]. 心理科学进展, 2013, 21 (6): 999-1006.
- Wang YY, Wang DM, Sui N. Neurodevelopmental mechanisms of prenatal cocaine or morphine exposure on addiction-related behaviors in offsprings [J]. Adv Psych Sci, 2013, 21(6): 999-1006.
- [18] 张克, 段颖, 杜秀敏. 亲代孕前成瘾药物暴露对子代行为的影响及其表观遗传机制 [J]. 心理科学进展, 2017, 25(10): 1791-1798.
- Zhang K, Duan Y, Du XM. The impact of the parental preconception exposure to addictive drugs on the offsprings' behavior and the epigenetic mechanism [J]. Adv Psych Sci, 2017, 25(10): 1791-1798.
- [19] 李重阳, 高先军, 王昱, 等. 海洛因、麻黄素对小鼠仔鼠下丘脑、海马组织结构及胆碱乙酰基转移酶活性的影响 [J]. 解剖学报, 2009, 40(6): 862-868.
- Li CY, Gao XJ, Wang Y, et al. Effects of heroin and ephedrine on the histological structure and ChAT activity of hypothalamus and hippocampus of filial mice [J]. Acta Anat Sin, 2009, 40 (6): 862-868.
- [20] 许梓枫, 丁之德. 毒品对生殖系统及胚胎发育的影响 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(1): 56-60.
- Xu ZF, Ding ZD. Effects of drugs on reproductive system and embryonic development [J]. J Intern Reprod Heal/Fam Plan, 2016, 35(1): 56-60.
- [21] 徐文锦, 陈为升, 刘惠芬. 药物成瘾的表观遗传学机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 20(3): 248-257.
- Xu WJ, Chen WS, Liu HF. Progress in research of epigenetic mechanisms of drug addiction [J]. Chin J Pharm Toxic, 2016, 20(3): 248-257.

[收稿日期] 2019-02-26