

韩雨,陈晨,王鑫峰,等. 雌性大鼠吸烟对仔鼠行为学影响的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 810-818.

Han Y, Chen C, Wang XF, et al. Effect of smoking on behavior of female rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 810-818.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.010

雌性大鼠吸烟对仔鼠行为学影响的研究

韩雨¹, 陈晨¹, 王鑫峰¹, 张海阳⁴, 陈俞⁴, 许德玮⁴, 姚铁翼⁴, 邵晓云^{1,3*}, 徐绍业^{2*}

(1. 桂林医学院基础医学院, 广西 桂林 541004; 2. 桂林医学院科学实验中心, 广西 桂林 541004; 3. 桂林医学院脑与认知神经重点实验室, 广西 桂林 541004; 4. 桂林医学院临床医学院, 广西 桂林 541004)

【摘要】 目的 探讨亲代成年雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠行为学及大脑皮层坍塌反应调节蛋白 1 (CRMP1)、死亡相关蛋白激酶 1 (DAK1) 蛋白表达的影响。**方法** 将 18 只 8 周龄健康 SD 雌性大鼠随机分为烟熏组 (9 只) 和对照组 (9 只), 烟熏组行香烟烟雾暴露构建烟熏模型, 对照组正常饲养, 烟熏 1 个月后将其与正常雄鼠合笼并继续烟熏直至分娩。将烟熏组和对照组分娩后的子代大鼠 (F1 代) 分别进行旷场实验、转棒疲劳实验、Morris 水迷宫实验等动物行为学检测, 分析亲代雌鼠香烟烟雾暴露后对其子代的焦虑情况、运动耐受能力、以及空间学习记忆能力的影响。Western Blot 检测不同发育阶段 (0、7、21 d 和 4 周) 各组子代大鼠的大脑皮层组织中 DAK1 和 CRMP1 蛋白表达情况。**结果** 在旷场实验结果显示, 烟熏组 F1 代子代大鼠在总区域中的运动总距离和平均运动速度明显增加 ($P < 0.05$), 其中进入中央区的次数、在中央区的运动距离和停留时间均较对照组 F1 代明显增加 ($P < 0.05$); 转棒疲劳实验结果发现, 烟熏组 F1 代持续运动时间以及运动距离较对照组均显著减少 ($P < 0.05$); Morris 水迷宫结果显示, 烟熏组和对照组 F1 代的逃避潜伏期和到达平台的游泳路程无明显差异, 但游泳速度较对照组明显下降 ($P < 0.05$); 烟熏组 F1 代在目标象限停留时间占比和进入目标象限次数均较对照组明显减少 ($P < 0.05$), 且平均游泳速度和总游泳路程也明显下降 ($P < 0.01$); 此外, Western Blot 结果表明, 烟熏组 F1 代大鼠脑组织中 DAK1 和 CRMP1 在发育早期 (0、7、21 d) 的蛋白表达均较对照组下降。**结论** 亲代雌鼠香烟烟雾暴露可能会增加其子代大鼠的焦虑情绪, 降低运动耐受能力, 并使得其空间记忆能力减退, 这可能与子代大鼠脑组织中 CRMP1 和 DAK1 分子的调控有关。

【关键词】 香烟烟雾暴露; 子代大鼠; 神经系统; 行为学; CRMP1; DAK1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0810-09

Effect of smoking on behavior of female rats

HAN Yu¹, CHEN Chen¹, WANG Xinfeng¹, ZHANG Haiyang⁴, CHEN Yu⁴, XU Dewei⁴, YAO Tieyi⁴,
SHAO Xiaoyun^{1,3*}, XU Shaoye^{2*}

(1. Basic Medicine College, Guilin Medical University, Guilin 541004, China. 2. Science Experiment Center, Guilin Medical College, Guilin 541004. 3. Key Laboratory of Brain and Cognitive Neuroscience, Guilin Medical College, Guilin 541004. 4. Department of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541004)

Corresponding author: SHAO Xiaoyun. E-mail: sxy2155@163.com; XU Shaoye. E-mail: shaoyexu@glmc.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金 (31660269), 广西自然科学基金 (2021GXNSFAA075004, 2017GXNSFAA198003, 2016GXNSFBA380098), 广西硕士研究生创新项目 (YCSW2022371), 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201810601011), 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助项目。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (31660269), Guangxi Natural Science Foundation of China (2021GXNSFAA075004, 2017GXNSFAA198003, 2016GXNSFBA380098), Guangxi Postgraduate Innovation Project (YCSW2022371), National Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (201810601011), the Project Supported by the Training Program of 1000 Young and Middle-Aged Backbone Teachers in Guangxi Colleges and Universities.

【作者简介】 韩雨 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: hayyy7@163.com

【通信作者】 徐绍业 (1979—), 男, 高级实验师, 硕士, 研究方向: 实验动物学。Email: shaoyexu@glmc.edu.cn;

邵晓云 (1978—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 神经退行性疾病。Email: sxy2155@163.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To investigate the effects of passive smoking in adult female rats on behavior and expression of collapsin response regulatory protein 1 (CRMP1) and death-related protein kinase 1 (DAPK1) in the cerebral cortex of offspring. **Methods** Eighteen 8-week-old healthy female SD rats were randomly divided into the passive smoking group ($n = 9$) and control group ($n = 9$). The passive smoking group was treated with smoke to establish the passive smoking model, whereas the control group was treated normally. After 1 month of smoking, female rats were mated with males and continued smoking until delivery. Offspring (F1 generation) of passive smoking and control groups were evaluated by an open field test, rotary rod fatigue test, and Morris water maze test. These animal behavior tests were conducted to analyze the effects of passive smoking on anxiety, exercise tolerance, and spatial learning and memory abilities of the offspring. Moreover, CRMP1 and DAPK1 protein expression in cerebral cortex tissues of offspring was detected by Western Blot at various developmental stages (0, 7, and 21 days and 4 weeks (adult)) after birth. **Results** The open field test showed that the total movement distance and average movement speed of the F1 generation in the passive smoking group were significantly increased in the total area ($P < 0.05$), and the number of entering the central area, and the movement distance and residence time in the central area were significantly increased compared with those of the control ($P < 0.05$). The rotary rod fatigue test showed that the sustained movement time and movement distance of the F1 generation in the passive smoking group were significantly reduced compared with those in the control group ($P < 0.001$). The Morris water maze showed that escape latency of the F1 generation had no significant difference between passive smoking group and control groups, but swimming speed was significantly decreased in the passive smoking group ($P < 0.001$). Compared with the control group, the proportion of time and time of the F1 generation entering the target quadrant in the passive smoking group were significantly decreased ($P < 0.05$), and the swimming speed and total swimming distance were also decreased significantly ($P < 0.01$). Additionally, Western Blot showed that CRMP1 and DAPK1 protein expression in offspring of the passive smoking group was significantly lower than that of the control group at 0, 7, and 21 days. **Conclusions** Passive smoking in parental female rats promoted anxiety, reduced exercise tolerance, and impaired spatial memory of offspring, which may be related to regulation of CRMP1 and DAPK1 expression in the brain tissue of offspring.

【Keywords】 cigarette smoke exposure; offspring rats; nervous system; animal behavior; CRMP1; DAPK1

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

香烟烟雾中含有大量尼古丁等有害化合物,长期处于此环境中的孕期哺乳类动物可导致胎儿流产、死胎、畸形等现象,同时吸烟对神经系统的发育和功能的影响也是其众多影响之一,其中烟草对神经传递和认知功能的发育有显著的负面影响^[1]。但香烟烟雾暴露对子代神经系统的影响及相关分子机理尚不清楚。坍塌反应调节蛋白(Collapsing response mediator proteins, CRMPs)家族包含 CRMP1、2、3、4、5 共 5 个成员,在神经系统发育过程中高度表达,是神经系统发育中的主要磷酸化蛋白之一^[2]。研究显示 CRMP1 能够调节微管的组装和微丝肌动蛋白的重组,介导神经营养因子诱导神经元突起的延伸,而 CRMP1 表达的减少同时影响微管的装配导致神经元轴突的稳定性下降和胞浆的运输障碍,直接导致神经元功能异常和退化,并促进神经元死亡。另外 CRMP1 和 CRMP2 能通过不同的信号通路调节树突棘成熟,促进/增加海马神经元突起的生长、脊柱的形成和树突棘的密度^[3]。CRMP1 和 CRMP4 是发育中的小鼠大脑锥体神经元树突正确定向所必需的^[4]。CRMP5 对视网膜神经

节细胞有着神经保护和神经再生作用^[5]。死亡相关蛋白激酶 1 (Death-associated protein kinase 1, DAPK1) 是一种钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[6],在机体中广泛参与由多种信号介导的细胞死亡过程^[7],同时在大脑中高度表达^[8]。研究表明,它与神经系统疾病相关的多种神经元损伤有关^[9]。DAPK1 作为细胞凋亡正调控因子,可通过上调 p53 基因的表达而促使细胞进入 I 型细胞凋亡程序,也可与非 p53 依赖的经典凋亡途径发生关联^[10]。另有研究发现,DAPK1 亦可诱导一种不需要半胱天冬酶参与的 II 型细胞死亡或称自体吞噬性细胞死亡^[9]。

实验前期研究初步证明了香烟烟雾暴露对胎儿多器官发育均有一定影响^[11]。本实验进一步研究亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠行为学的影响,通过旷场实验、转棒疲劳实验和 Morris 水迷宫实验从整体水平检测大鼠的焦虑、运动耐受能力、以及对空间位置和方向的学习记忆能力的影响。同时,在分子水平通过 Western Blot 检测亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠大脑皮层组织中 DAPK1 和

CRMP1 蛋白表达的影响。旨在阐明亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代神经系统行为学的影响及其机制,为预防和治疗香烟烟雾暴露引起的神经系统损伤提供分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 18 只 7 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠,体重 200 ~ 220 g,雄性 9 只,体重 220 ~ 240 g,均购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。大鼠饲养提供标准饲料,饮用高压灭菌水,光照和黑暗各 12 h 轮流交替,湿度保持在 60%左右,温度控制在 22℃左右,饲养于桂林医学院实验动物中心【SYXK(桂)2020-0005】。动物实验经桂林医学院实验动物伦理委员会审查,符合动物福利伦理相关要求(GLMC-IACUC-2021006)。

1.1.2 主要试剂与仪器

广西某品牌香烟(20支/包);RIPA 裂解液(Beyotime Biotechnology,上海,中国);PMSF 苯甲基磺酰氟(Solarbio Life Sciences,北京,中国);磷酸酶抑制剂(MCE, Monmouth Junction, NJ, 美国);兔源 CRMP1 多克隆抗体(Proteintech Rosemont, IL, 美国);兔源 DAPK1 多克隆抗体(Proteintech Rosemont, IL, 美国);鼠源 GAPDH 单克隆抗体(Proteintech Rosemont, IL, 美国);Protein marker(Thermo Waltham, MA, 美国);BCA 试剂盒(Beyotime Biotechnology,上海,中国);ECL 发光试剂盒(Thermo Waltham, MA, 美国)。

自制半封闭式烟熏染毒箱(150 cm × 60 cm × 60 cm);旷场装置(型号 XR-XZ301)、转棒疲劳仪(型号 XR1514-RZPM)、Morris 水迷宫(型号 XR-XM101),均由上海欣软信息科技有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 烟熏大鼠模型的建立及分组

参照徐绍业等^[12]使用的自制半封闭式烟熏染毒箱(150 cm × 60 cm × 60 cm),以饲养箱为骨架,分为上下两层,箱两边预留 1 cm × 1 cm 通气孔各 3 个。参照陈茜等^[13]烟熏模型方法并改进,在箱内上下层各设置一个燃烟点,每个燃烟点每次连续自燃香烟 10 支,烟熏维持约 60 min,每天 2 次(9:00, 15:00)。将亲代雌鼠随机分为烟熏组和对照组各 9 只,烟熏组雌鼠置于半封闭式烟熏染毒箱,对照组

雌鼠于同环境、同饲料喂养,但不给予烟雾吸入;用于合笼交配的雄鼠 9 只不作处理,正常饲养。烟熏 1 个月后,将烟熏组和对照组雌鼠分别以 2 : 1 比例与雄鼠合笼(每晚 19:00),次日晨分笼,反复数日,直至确定雌鼠怀孕则停止合笼。待孕鼠分娩出子代大鼠后则停止烟熏处理,烟熏持续两个月左右。随后在烟熏组和对照组中不同亲代大鼠繁育的后代中筛选出体重相当的 3 窝仔鼠(每窝分别为 11 只、12 只、13 只),待成年(约 4 周龄)进行旷场实验、转棒疲劳实验、Morris 水迷宫实验。同时,收集不同发育阶段(0、7、21 d 和 4 周)烟熏组和对照组子代大鼠的大脑皮层脑组织,Western Blot 检测 CRMP1 和 DAPK1 蛋白的表达情况。实验使用戊巴比妥钠过量麻醉对大鼠进行安乐死处理。

1.2.2 旷场实验

旷场实验检测大鼠自发探索能力、活动能力和焦虑情绪。SD 大鼠选用旷场装置(50 cm × 50 cm × 50 cm)为底部和侧壁均为黑色有机板的自发活动箱,应用自发活动视频分析系统将自发活动箱平均分为 25 格,设定周边 16 格为外周区,中间 9 格为中央区。实验前将待测大鼠置于旷场装置自由停留 5 min 进行环境适应,每天 1 次,连续 2 d。正式实验时间尽量与环境适应时间一致。正式实验即将待测大鼠放入旷场装置底板中心,随后使其自由活动 300 s,记录子代大鼠全程运动总距离、平均运动速度,以及进入中央区和外周区的次数、在中央区和外周区的运动距离和停留时间,子代大鼠运动路径图见图 1A。

1.2.3 转棒疲劳实验

转棒疲劳实验检测大鼠的运动耐受能力。预先将待测大鼠置于转棒疲劳仪(转棒直径 60 mm,跑道宽度 80 mm)进行训练,每次以 40 r/min 转速持续 5 min,每只大鼠每天训练 3 次,期间间隔 15 min,共训练 2 d。2 d 后进行正式测试,每只鼠测试 3 次,方法与训练期相同,记录大鼠在转棒疲劳仪上的持续运动时间及运动距离,取平均值。

1.2.4 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验检测大鼠对位置和方向的空间学习记忆能力。水迷宫水池直 160 cm,将水池均分为 4 个象限,设置隐匿逃生平台(直径 8 cm)于其中 1 个象限的中央,根据 4 个象限分别以 A、B、C、D 标记为大鼠 4 个人水点。注水深度 50 cm,注水后使平台没入水面以下 1 cm,实验时向水池内注入黑

色墨水使之与池水混匀。测试期间迷宫外部各参照物保持不变,水温维持(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 。首先进行获得性训练(即定位航行实验),随机选择一个入水点将大鼠面向池壁轻轻放入水中,若 2 min 内四肢登上隐匿平台,则使其在平台上停留 15 s;若 2 min 内尚未找到平台,则人为引导其寻找平台并停留 15 s,每只大鼠每天训练 4 次,分别从 4 个不同的入水点入水,每次训练间隔 15 ~ 20 min,连续 5 d,记录大鼠的逃避潜伏期、到达平台的游泳路程、以及平均游泳速度。第 6 天进行空间探索实验,即在定位航行实验基础上撤除逃生平台,将待测大鼠从原平台象限(目标象限)的对侧入水,计时 2 min,记录大鼠到达目标象限的时间、进入目标象限的次数、在目标象限停留时间、平均游泳速度、总游泳路程。

1.2.5 Western Blot

取烟熏组 and 对照组子代大鼠不同生长阶段的大脑皮层组织,用 RIPA 裂解液(临用时添加蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂)完全裂解脑组织,提取大脑皮层组织总蛋白,采用 BCA 试剂盒法测定蛋白浓度。将各组蛋白样品按一定顺序加入上样孔,进行电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭 2 h 后,选择目的抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱旋转孵育过夜,次日用 $1 \times$ TBST 洗膜后进行室温二抗孵育 1 h,再次洗膜后应用 ECL 化学发光液对目的蛋白条带进行曝光显影。

1.3 统计学分析

结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均用 SPSS 25 和 GraphPad Prism 8 软件处理,若两组独立样本符合正态分布且方差齐,则采用独立样本 t 检验,反之则采用非参数检验(Wilcoxon 秩和检验)。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 亲代雌鼠香烟烟雾暴露增强了子代大鼠的焦虑感

旷场实验结果显示,烟熏组子代大鼠在总区域较对照组的运动总距离($P < 0.05$,图 1B)和平均运动速度($P < 0.05$,图 1C)明显增加;子代大鼠在中央区的运动情况显示,烟熏组子代大鼠进入中央区的次数($P < 0.05$,图 1D)、在中央区的运动距离($P < 0.05$,图 1E)、以及在中央区的停留时间($P < 0.05$,图 1F)明显增加。同时,子代大鼠在外周区的运动情况表现为,烟熏组较对照组子代大鼠进入外周区的次数($P < 0.05$,图 1G)和在外周区运动的距

离($P < 0.05$,图 1H)明显增加,但烟熏组子代大鼠在外周区停留时间有所减少($P < 0.05$,图 1I)。上述结果推测,亲代雌鼠香烟烟雾暴露可能促使子代大鼠运动亢奋激发其探索新知的能力,同时也增加了子代大鼠的焦虑情绪(见图 1)。

2.2 亲代雌鼠香烟烟雾暴露降低子代大鼠的运动耐受能力

转棒疲劳实验结果显示,烟熏组子代大鼠在转棒疲劳仪上的持续运动时间($P < 0.001$,图 2A)和运动的距离($P < 0.001$,图 2B)较对照组子代大鼠显著减少。表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露会导致子代大鼠运动耐受能力显著下降(见图 2)。

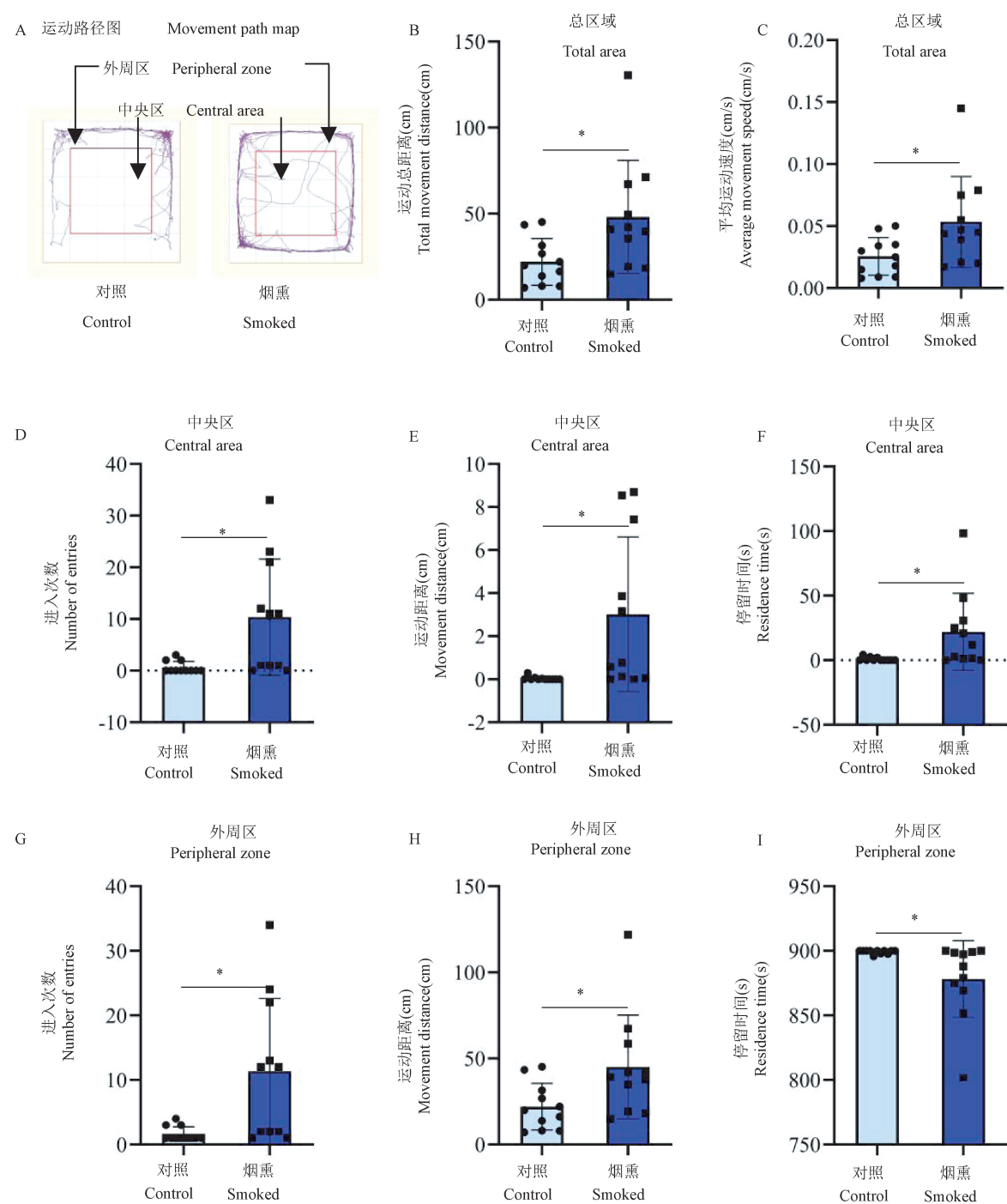
2.3 亲代雌鼠香烟烟雾暴露对子代大鼠空间学习和记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验结果显示,在获得性训练的定位航行实验中,烟熏组子代大鼠的逃避潜伏期($P > 0.05$,图 3A)和抵达平台的运动路程($P > 0.05$,图 3B)与对照组无显著性差异。随着训练天数的增加,子代大鼠逃避潜伏期和抵达平台的运动路程均逐渐缩小,表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露并没有影响子代大鼠的学习能力,但烟熏组子代大鼠的游泳速度较对照组明显下降($P < 0.001$,图 3C)。

在撤除平台后进行的空间探索实验中,烟熏组子代大鼠较对照组在目标象限停留的时间占比下降($P < 0.05$,图 3D),进入目标象限的次数明显减少($P < 0.05$,图 3E)。整个游泳过程中烟熏组子代大鼠的平均游泳速度明显降低($P < 0.01$,图 3F),总游泳路程也较对照组显著减少($P < 0.01$,图 1G)。这表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露会导致其子代大鼠的空间记忆能力减退,且运动能力也明显减弱(见图 3)。

2.4 不同发育阶段子代大鼠大脑皮层中 CRMP1、DAPK1 的蛋白表达情况

Western Blot 结果显示,烟熏组子代 CRMP1 蛋白在 0 d($P < 0.001$,图 4A,4B)、7 d($P < 0.05$,图 4C,4D)、21 d($P < 0.05$,图 4E,4F)的表达水平均显著低于对照组。而在 4 周($P > 0.05$,图 4G,4H)时,两组间 CRMP1 蛋白表达无明显差异。DAPK1 蛋白的表达水平在各个检测阶段 0 d($P < 0.001$,图 4A,4B)、7 d($P < 0.01$,图 4C,4D)、21 d($P < 0.05$,图 4E,4F)、4 周($P < 0.001$,图 4G,4H)均具有显著性差异,尤其是在发育早期。表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露可影响子代大鼠大脑皮层中 CRMP1 和 DAPK1 的表达(见图 4)。



注:A:子代大鼠在旷场装置上的运动路径图;B:子代大鼠在总区域的运动总距离;C:子代大鼠在总区域的平均运动速度;D:子代大鼠进入中央区的次数;E:子代大鼠在中央区的运动距离;F:子代大鼠在中央区的停留时间;G:子代大鼠进入外周区的次数;H:子代大鼠在外周区的运动距离;I:子代大鼠在外周区的停留时间;与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图1 烟熏组和对照组子代大鼠的旷场实验结果($n = 11$)

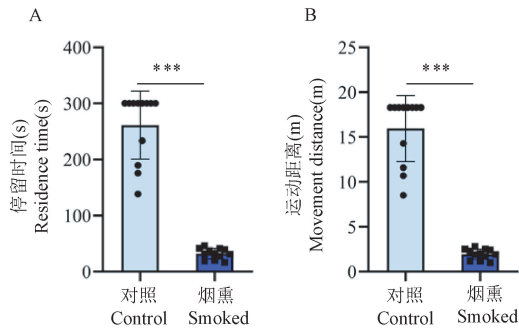
Note. A. Movement path map of offspring rats on the open field device. B. The total movement distance of offspring rats in the total area. C. Average movement speed of offspring rats in the total area. D. The number of offspring rats entering the central region. E. Movement distance of offspring rats in the central region. F. Residence time of offspring rats in central region. G. The number of offspring rats entering the peripheral area. H. Movement distance of offspring rats in peripheral area. I. Residence time of offspring rats in peripheral area. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Open field test results of offspring rats in the smoked group and the control group($n = 11$)

3 讨论

众所周知,中国是一个烟草生产和消费大国。虽然中国女性有吸烟习惯者较欧美女性少,但是中国男性吸烟者众多,由此导致的女性被动吸入二手烟的几率亦随之增加。香烟烟雾中含有的大量尼古丁等有害化合物被母体吸收后将导致孕妇妊娠期并发症^[14],也可能通过胎盘屏障进入胎儿体内影响胎儿大脑发育^[15],怀孕期间长期处于此环境可导致胎盘早剥、流产、死产、早产(< 37 周妊娠)和低出生体重(< 2500 g)^[16]等,并且会导致胎儿神经发育不良及后代多指(趾)畸形等有害影响。

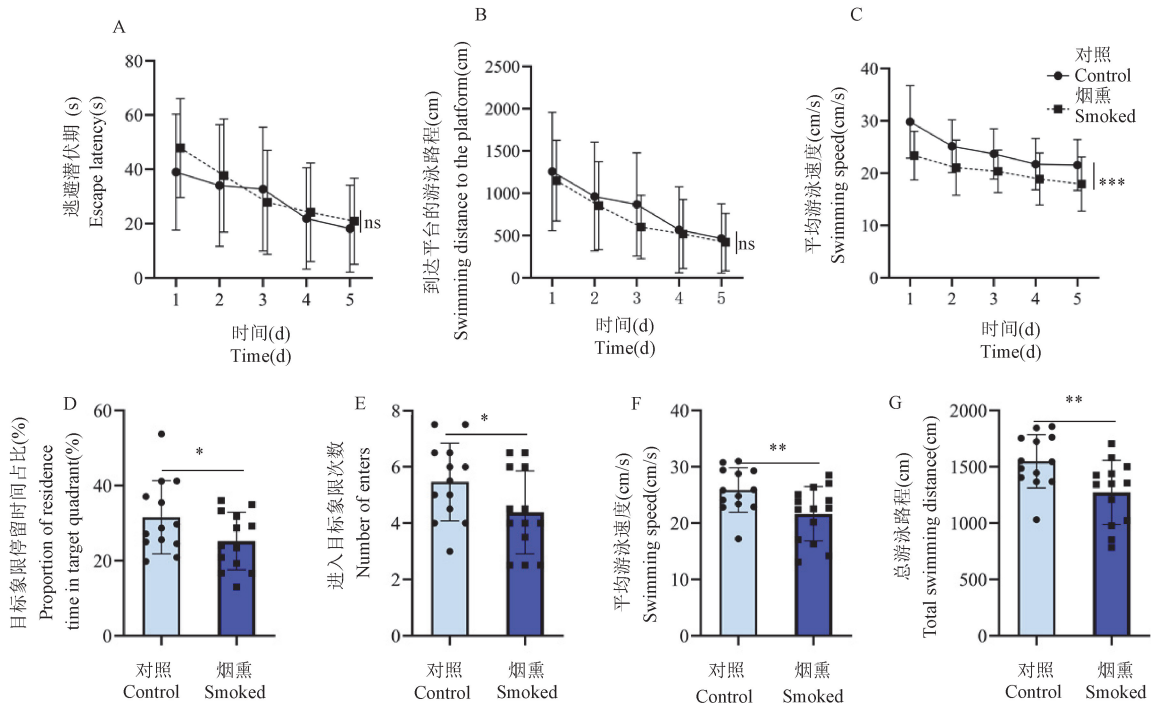
到目前为止,孕妇香烟烟雾暴露对后代大脑神经系统发育的影响及相关分子机理尚不清楚。为了探究香烟烟雾暴露对其子代神经系统发育的影响,本研究通过香烟烟雾暴露对亲代雌鼠进行烟熏



注:A:子代大鼠的运动时间;B:子代大鼠的运动距离;与对照相比,*** $P < 0.001$ 。

图 2 烟熏组和对照组子代大鼠转棒疲劳实验结果($n = 12$)
Note. A. Exercise time of offspring rats. B. Movement distance of offspring rats. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Results of rod-rotating fatigue test of offspring rats in the smoked group and control group($n = 12$)

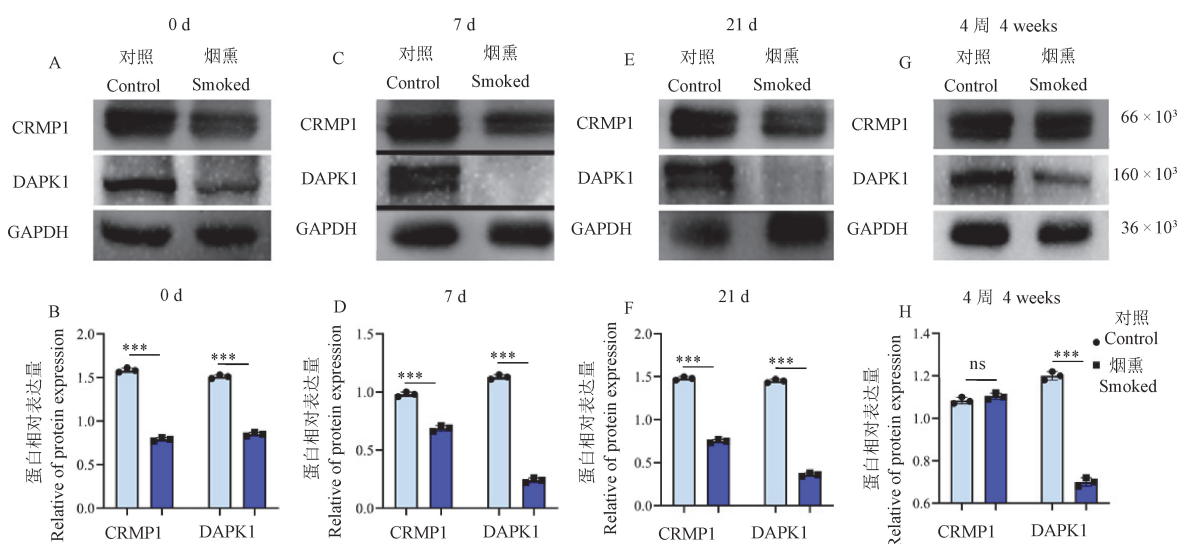


注:定位航行实验:A:子代大鼠的逃避潜伏期,B:子代大鼠抵达平台的游泳路程,C:子代大鼠的平均游泳速度;空间探索实验:D:子代大鼠在目标象限停留时间占比,E:子代大鼠进入目标象限的次数,F:子代大鼠的平均游泳速度,G:子代大鼠的总游泳路程;与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下同)

图 3 烟熏组和对照组子代大鼠 Morris 水迷宫实验结果($n = 13$)

Note. The positioning navigation experiment. A. Escape latency of offspring rats. B. The swimming distance of offspring rats reaching the platform. C. Average swimming speed of offspring rats. The space exploration experiment. D. Proportion of residence time of offspring rats in target quadrant. E. The number of offspring rats entering the target quadrant. F. Average swimming speed of offspring rats. G. Total swimming distance of offspring rats. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Morris water maze test results of offspring rats in the smoking group and control group($n = 13$)



注: A, B: 子代大鼠出生 0 d; C, D: 子代大鼠出生 7 d; E, F: 子代大鼠出生 21 d; G, H: 子代大鼠出生 4 周。

图 4 Western Blot 检测烟熏组和对照组子代大鼠不同发育阶段大脑皮层 CRMP1、DAPK1 蛋白表达情况

Note. A, B. Progeny rats were born 0 d. C, D. Progeny rats were born for 7 d. E, F. Progeny rats were born for 21 d. G, H. The progeny rats were born 4 weeks.

Figure 4 Western Blot analysis of CRMP1 and DAPK1 protein expression in cerebral cortex of offspring rats at different developmental stages in the smoking group and the control group

处理,并通过动物行为学检测子代大鼠在情绪、运动能力及学习记忆等方面的变化。烟熏组和对照组亲代雌鼠分别娩出 53 只和 72 只子代大鼠,其中对部分成年期子代大鼠(4 周)进行动物行为学检测,部分发育期(0 d, 7 d, 21 d, 4 周)子代大鼠进行 Western Blot 检测。

旷场实验结果显示,烟熏组子代大鼠进入旷场中央区的频率更高,且其在总区域的运动总路程和平均运动速度均较对照组明显增加,这可能与亲代雌鼠香烟烟雾暴露导致其子代大鼠过度活跃有关。有研究比较了在亲代雄鼠和雌鼠中尼古丁暴露对其子代大鼠的行为学影响,结果发现尼古丁暴露的雌鼠其子代大鼠表现为过度活跃和冲动性行为增加^[17]。Liu 等^[18]曾报道亲代雌性接触尼古丁可能会导致子代大鼠产生神经生物学障碍,如多动症、学习和记忆问题等。同时,本研究结果还显示,烟熏组子代大鼠在外周区和中央区之间的穿越次数亦较对照组明显增多,由此表明,亲代雌鼠香烟烟雾暴露后将导致其子代更强烈的焦虑感,这与 Zhou 等^[19]的研究结果一致,即母体尼古丁暴露的子代在幼年期表现出身体和神经行为发育迟缓,增加焦虑水平。

二手烟暴露将会引起哮喘、呼吸道感染、肺生长和功能受损、运动耐受性下降、认知障碍、行为问

题等多种不良健康风险。多项研究表明,香烟烟雾暴露可减缓小鼠的生长发育,并使小鼠的运动能力明显减弱^[20-21]。但目前关于亲代香烟烟雾暴露后对子代运动能力影响的报道甚少。本研究转棒疲劳实验结果显示,亲代烟熏组的子代大鼠运动耐受能力显著下降,与对照组存在极显著性差异($P < 0.001$)。由此可见,亲代香烟烟雾暴露也可影响其子代的运动耐受能力。

Morris 水迷宫主要用于检测实验动物的学习和记忆能力。本研究在 Morris 水迷宫前 5 d 的获得性训练中表现为,子代大鼠的逃避潜伏期和寻找平台的总路程在烟熏组和对照组之间无明显的差异;随着训练天数的延长,二者潜伏时间和寻找路程均随之缩短,且二者几乎趋于一致。上述研究表明,亲代大鼠香烟烟雾暴露并不影响子代大鼠的学习能力。这与 Alzoubi 等^[22]在水烟暴露对大鼠学习能力影响的研究结果相一致。但是,烟熏组子代大鼠的平均游泳速度却较对照组明显降低,这进一步说明亲代雌鼠香烟烟雾暴露会对子代大鼠的运动能力产生不良影响,这与转棒疲劳实验结果一致。在后续的空间探索实验中,烟熏组子代大鼠在目标象限停留的时间以及进入目标象限的次数都明显减少,由此表明,亲代雌鼠香烟烟雾暴露后会影子代大鼠的空间记忆能力。此前一项关于水烟环境对大

鼠学习记忆影响的研究发现,接触水烟环境的大鼠会导致短期和长期记忆受损^[22]。而且,据报道,围产期尼古丁暴露会导致子代小鼠的注意力和记忆力的显著缺陷,有趣的是,这一缺陷具有性别依赖性,雄性后代而非雌性后代更明显^[23]。同时,在空间探索实验中,亲代烟熏组雌鼠的子代大鼠的平均游泳速度以及总游泳路程也明显减少,同样表明,亲代雌鼠香烟烟雾暴露会减弱子代大鼠的运动能力。

有研究表明,香烟烟雾暴露会诱发脑部炎症和氧化应激^[24],在子代小鼠大脑皮层产生炎症反应,如坏死和细胞质空泡化,还观察到大量的凋亡细胞和死亡的神经元,对大脑的功能产生负面影响,从而导致子代小鼠记忆功能的异常^[25]。为了探究亲代香烟烟雾暴露对子代生长发育及凋亡的影响,本研究分别收集子代大鼠出生后不同阶段(0 d、7 d、21 d、4 周)的大脑皮层组织,并选择与发育和凋亡相关的靶分子 CRMP1 和 DAPK1 进行蛋白水平检测,从结果可以看出,烟熏组子代大鼠较正常组子代大鼠脑组织中 CRMP1 和 DAPK1 蛋白表达水平均显著降低。由于 CRMP1 具有调节树突棘成熟、促进/增加海马神经元突起的生长、脊柱的形成以及增加树突棘密度的功能^[3],推测亲代大鼠香烟烟雾暴露导致 CRMP1 显著下降,可能造成树突棘的成熟障碍,并导致神经元突起生长受限,从而影响了脑细胞的正常生理功能;同时,DAPK1 作为细胞凋亡正调控因子,促进细胞凋亡^[6],广泛参与由多种信号介导的细胞死亡过程^[7],而亲代大鼠香烟烟雾暴露致使子代大鼠脑组织中 DAPK1 的表达降低,可能打破了脑组织中正常细胞凋亡和发育的平衡。但亲代雌鼠香烟烟雾暴露后导致其子代大鼠产生的一系列行为学改变(焦虑、运动耐受能力减退、空间记忆能力减退等)是否与 CRMP1、DAPK1 相关联,该靶分子调节子代大鼠行为学改变的机制如何则仍需进一步探讨。

本研究结果表明亲代雌鼠香烟烟雾暴露可增强子代大鼠的焦虑感、降低其运动耐受能力,并导致子代大鼠的记忆力减退,这可能与 CRMP1 和 DAPK1 的调节有关。于此,我们认为有必要以多种形式开展反吸烟宣传活动,提高公众对二手烟危害的认识以及保护女性及儿童们免受其害,并从分子生物学角度进一步探索香烟烟雾暴露导致神经系统损害的治疗靶点。

参 考 文 献(References)

- [1] Hajdusianek W, zórawik A, Waliszewska-Proszół M, et al. Tobacco and nervous system development and function-new findings 2015–2020 [J]. Brain Sci, 2021, 11(6): 797.
- [2] Nakamura F, Ohshima T, Goshima Y. Collapsin response mediator proteins: their biological functions and pathophysiology in neuronal development and regeneration [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 188–200.
- [3] Zhang ZQ, Zhang JF, Li J, et al. Ketamine Regulates Phosphorylation of CRMP2 to mediate dendritic spine plasticity [J]. J Mol Neurosci, 2020, 70(3): 353–364.
- [4] Takaya R, Nagai J, Piao W, et al. CRMP1 and CRMP4 are required for proper orientation of dendrites of cerebral pyramidal neurons in the developing mouse brain [J]. Brain Res, 2017, 1655: 161–167.
- [5] Lauzi J, Anders F, Liu H, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of CRMP-5 on retinal ganglion cells in an experimental *in vivo* and *in vitro* model of glaucoma [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0207190.
- [6] Su Y, Deng MF, Xiong W, et al. MicroRNA-26a/Death-Associated Protein kinase 1 signaling induces synucleinopathy and dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease [J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(9): 769–781.
- [7] Sulaiman Alsaadi M. Role of DAPK1 in neuronal cell death, survival and diseases in the nervous system [J]. Int J Dev Neurosci, 2019, 74: 11–17.
- [8] Wang S, Shi XD, Li H, et al. DAPK1 signaling pathways in stroke: from mechanisms to therapies [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(6): 4716–4722.
- [9] Singh P, Ravanani P, Talwar P. Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): a regulator of apoptosis and autophagy [J]. Front Mol Neurosci, 2016, 9: 46.
- [10] Pei L, Shang Y, Jin H, et al. DAPK1-p53 interaction converges necrotic and apoptotic pathways of ischemic neuronal death [J]. J Neurosci, 2014, 34(19): 6546–6556.
- [11] 徐绍业, 曹山虎, 张大红, 等. 被动吸烟对大鼠卵泡发育和胚胎发育的影响 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(17): 3194–3197.
- Xu SY, Cao SH, Zhang DH, et al. Effects of passive smoking on follicular development and embryo development in rats [J]. Modern Prev Med, 2014, 41(17): 3194–3197.
- [12] 徐绍业, 易瑾希, 冯希瑶, 等. 孕期被动吸烟动物模型的制备方法概述 [J]. 现代预防医学, 2018, 45(11): 2056–2058.
- Xu SY, Yi JX, Feng XY, et al. Constructing methods on passive smoking animal models during pregnancy [J]. Modern Prev Med, 2018, 45(11): 2056–2058.
- [13] 陈茜, 陈瑞. 香烟烟雾诱导小鼠 COPD 模型 B 细胞免疫与气流受限的研究 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2021, 26(3): 229–232.
- Chen Q, Chen R. Study on B-cell immunity and airflow

- restriction induced by cigarette smoke in mice with COPD [J]. Lingnan J Emerg Med, 2021, 26(3): 229-232.
- [14] Braun M, Klingelhöfer D, Oremek GM, et al. Influence of second-hand smoke and prenatal tobacco smoke exposure on biomarkers, genetics and physiological processes in children-an overview in research insights of the last few years [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(9): 3212.
- [15] 王晨冉, 孙杨华, 徐韬. 孕妇吸烟与儿童孤独症谱系障碍关系队列研究的 Meta 分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1921-1926.
- Wang CR, Sun YH, Xu T. Maternal smoking and childhood autism spectrum disorders: a Meta-analysis [J]. Chin J Epidemiol, 2020, 41(11): 1921-1926.
- [16] Claire R, Chamberlain C, Davey MA, et al. Pharmacological interventions for promoting smoking cessation during pregnancy [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 3(3): CD010078.
- [17] Lee H, Chung S, Noh J. Maternal nicotine exposure during late gestation and lactation increases anxiety-like and impulsive decision-making behavior in adolescent offspring of rat [J]. Toxicol Res, 2016, 32(4): 275-280.
- [18] Liu F, Tao XR, Pang G, et al. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation period affects behavior and hippocampal neurogenesis in mouse offspring [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1569.
- [19] Zhou L, Tao X, Pang G, et al. Maternal nicotine exposure alters hippocampal microglia polarization and promotes anti-inflammatory signaling in juvenile offspring in mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 661304.
- [20] 黄凡, 蒋九江, 陈华杰. 被动吸烟对小鼠运动能力的影响 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2011, 32(1): 50-54.
- Huang F, Jiang JJ, Chen HJ. Effect of passive smoking to mouse movement ability [J]. J Jinggangshan Univ (Natural Sci Edit), 2011, 32(1): 50-54.
- [21] 王建设, 朱命琪. 被动吸烟对小鼠生长及有氧运动能力的影响 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2010, 38(3): 164-166.
- Wang JS, Zhu MQ. Influence on weight and the ability of aerobic exercise in passive smoking mice [J]. J Henan Normal Univ (Natural Sci Edit), 2010, 38(3): 164-166.
- [22] Alzoubi KH, Khabour OF, Alharahshah EA, et al. The effect of waterpipe tobacco smoke exposure on learning and memory functions in the rat model [J]. J Mol Neurosci, 2015, 57(2): 249-256.
- [23] Zhang L, Spencer TJ, Biederman J, et al. Attention and working memory deficits in a perinatal nicotine exposure mouse model [J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0198064.
- [24] Wilson CB, McLaughlin LD, Nair A, et al. Inflammation and oxidative stress are elevated in the brain, blood, and adrenal glands during the progression of post-traumatic stress disorder in a predator exposure animal model [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76146.
- [25] Prasedya ES, Ambana Y, Martyasari NWR, et al. Short-term E-cigarette toxicity effects on brain cognitive memory functions and inflammatory responses in mice [J]. Toxicol Res, 2020, 36(3): 267-273.

[收稿日期] 2022-03-18

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊、被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!