

DOI: 10.16783/j.cnki.nwnuz.2018.05.012

## 孕鼠注射海洛因对仔鼠小脑组织和 抗氧化酶活性的影响

俞诗源, 何玲慧, 朱嘉宁, 陈 诚, 王小勇\*

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 为探讨孕鼠注射海洛因后对仔鼠小脑组织与抗氧化酶活性的影响, 对48只孕鼠(第9天开始)每天早晚分别注射浓度为2,4和6 g·L<sup>-1</sup>的海洛因溶液和等量生理盐水(每天2次, 每次0.2 mL)直到分娩后第15 d, 称量检测仔鼠体重和小脑重的变化, 用比色法检测小脑组织谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量及过氧化氢酶(CAT)活性的变化, 用光学显微技术观察小脑组织结构的变化. 结果表明, 与对照组相比, 海洛因组仔鼠体重、小脑重及小脑指数均降低, 仔鼠小脑组织出现不同程度的病理变化, 细胞排列疏松而凌乱, 浦肯野细胞形态不规则、核固缩, 细胞出现空泡化和凋亡等现象; 仔鼠小脑组织CAT活性及GSH含量均降低( $P < 0.05$ ), MDA含量则升高( $P < 0.05$ ), 表明孕鼠注射海洛因对仔鼠小脑组织结构与抗氧化功能有明显的损伤效应.

**关键词:** 海洛因; 小脑组织; 过氧化氢酶(CAT); 谷胱甘肽(GSH); 丙二醛(MDA)

中图分类号: R 285.5; D 919.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-988X(2018)05-0063-05

## Effect on the cerebellar tissue and antioxidant enzymes activities of newborn mice after injected heroin in pregnant mice

YU Shi-yuan, HE Ling-hui, ZHU Jia-ning, CHEN Cheng, WANG Xiao-yong

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

**Abstract:** To investigate the effect of heroin on cerebellum tissue structure and antioxidant enzymes activities of newborn mice, 48 pregnant mice are separately injected different concentrations(2,4 and 6 g·L<sup>-1</sup>) heroin which is content 0.2 mL and equivalent saline until delivery 15 day(twice a day). The changes of weight and cerebellum weight are measured at 5,10 and 15 days after birth and the activity of catalase (CAT). The contents of glutathione(GSH), malondialdehyde(MDA) detected by colorimetric method and the microstructure of cerebellum are observed with optical microscopy. The results show that the body weight, cerebellum weight and cerebellum index of heroin group are reduced than the control group. There are different degrees pathological changes in the cerebellum tissue, the cells are loosely and disorderly arrange. The shape of purkinje cell morphology is irregular. Nuclear pyknosis, vacuolization and apoptosis appears in cell. Catalase(CAT) activity and glutathione(GSH) content in the cerebellum of offspring rats decrease ( $P < 0.05$ ), and malondialdehyde(MDA) content increased ( $P < 0.05$ ). Above results indicate that heroin injection has significantly scathing effect on the structure and antioxidant function of cerebellum in offspring rats.

**Key words:** heroin; cerebellar tissue; catalase(CAT); glutathione(GSH); malondialdehyde(MDA)

收稿日期: 2018-04-26; 修改稿收到日期: 2018-07-13

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(1107RJZA141); 兰州市社会发展项目(2013-3-72, 2014-1-105)

作者简介: 俞诗源(1957—), 男, 甘肃兰州人, 教授, 博士, 博士研究生导师. 主要研究方向为组织发生和毒理学.

E-mail: syyu006@nwnu.edu.cn

\* 通讯联系人, 男, 助教, 博士研究生. 主要研究方向为细胞生物学. E-mail: xiaoyongwang217@126.com

海洛因 (Heroin), 学名二乙酰吗啡 (Diacetylmorphine hydrochloride), 具有吗啡的镇痛和麻醉功能, 易成瘾. 海洛因溶于水, 脂溶性强, 吸收、扩散快, 进入体内作用强、起效快, 能很快透过血脑屏障与脑内相应的受体结合而产生强烈的毒性反应. 海洛因可导致呼吸抑制引起脑缺血缺氧, 发生脑水肿而致神经元损伤和消失<sup>[1]</sup>. 如果妊娠期女性或哺乳期女性吸食海洛因有可能影响胎儿或婴幼儿的生长发育, 如果子宫内海洛因暴露可引起新生儿发育迟缓和神经行为损伤, 导致机体认知行为缺陷<sup>[2-3]</sup>.

有研究显示海洛因可使小鼠下丘脑和海马组织结构受损<sup>[4]</sup>, 但阿片类毒品是否通过母鼠胎盘影响仔鼠小脑组织结构和抗氧化应激系统鲜有研究. 为了研究妊娠期女性或哺乳期女性吸食兴奋剂对婴幼儿小脑组织结构及抗氧化酶活力的影响, 文中以昆明小鼠为模型, 给孕鼠注射不同剂量的海洛因溶液, 通过观察其仔鼠小脑组织结构和过氧化氢酶活性以及谷胱甘肽、丙二醛含量的变化, 分析探讨孕鼠使用兴奋剂后对仔鼠器官功能的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂

盐酸海洛因(甘肃省公安厅提供)用蒸馏水配制成 2, 4 和 6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度梯度的水溶液(根据小鼠半数致死剂量和成瘾剂量配制而成<sup>[4]</sup>), 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存备用, 谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所.

### 1.2 实验动物及给药

选昆明小鼠 96 只(兰州大学医学动物中心提供, 体重 30~40 g), 按雌雄小鼠 1:1 合笼交配, 次日早晨做雌鼠阴道检查, 出现阴栓或精子涂片观察到精子即记为妊娠第 1 d. 48 例受孕小鼠随机分为 4 组(对照组和海洛因 1, 2, 3 组, 每组 12 只). 各海洛因组孕小鼠从受孕第 9 天开始腹腔分别注射 2, 4, 6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的海洛因溶液 0.2 mL, 每天 2 次(9:30, 16:30), 直到孕鼠分娩后第 15 d, 对照组注射等量生理盐水. 分别在仔鼠出生后第 5, 10, 15 d 用电子天平称量仔鼠体重后, 断头处死<sup>[5]</sup>, 再迅速取仔鼠小脑在预冷的生理盐水中漂洗后称重, 左半小脑入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存, 右半小脑入 15% 的福尔马林液中固定备用.

### 1.3 酶活性测定

分别取上述冻存的各组仔鼠小脑组织块, 精确称重后, 滴加小脑组织重量 9 倍的生理盐水, 冰浴匀浆 5 min, 制成 10% 的组织匀浆, 用高速冷冻离心机(TGL-16 M 型, Beckman 公司, 美国) 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 用微量移液器吸取上清液, 按照试剂盒的操作要求, 用 V-5000 可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)在 420, 405, 532 nm 检测 GSH、CAT 及 MDA 的吸光度值.

### 1.4 小脑组织观察

将福尔马林液中固定的各组仔鼠小脑组织块常规石蜡包埋, 连续切片(厚度 6  $\mu\text{m}$ ), HE 染色, 光学显微镜(Nikon HFX- II A)下观察并摄片.

### 1.5 数据处理

用 SPSS 15.0 统计学软件对实验数据进行分析, 结果以均值  $\pm$  标准差表示.

## 2 结果与分析

### 2.1 仔鼠体重和小脑重及小脑指数的变化

由图 1 和图 2(不同小写字母表示组间差异显著, 下同)可知, 孕鼠注射海洛因后, 仔鼠的体重、小脑重均有不同程度降低. 海洛因剂量越大, 仔鼠体重、小脑重下降越多, 与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ). 由图 3 知, 孕鼠注射海洛因后, 仔鼠出生 5 d 时小脑指数略有升高, 但 10 d, 15 d 时均低于对照组( $P < 0.05$ ).

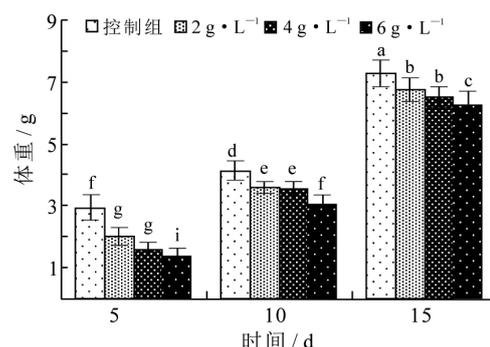


图 1 海洛因对仔鼠体重的影响

Fig 1 Effect of heroin on body weight of newborn mice

### 2.2 仔鼠 CAT 活性和 GSH、MDA 含量的变化

由图 4~6 可知, 孕鼠注射海洛因后, 仔鼠小脑组织 CAT 活性及 GSH 含量均有不同程度的降低, 与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), 而仔鼠小脑组织 MDA 含量则升高, 与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ).

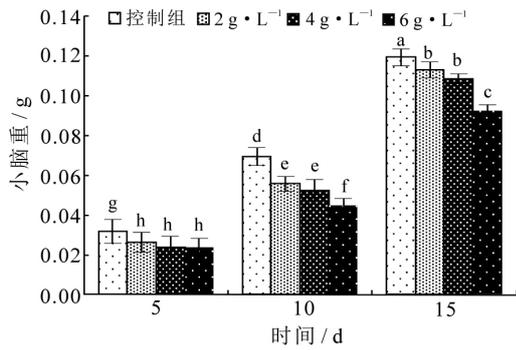


图 2 海洛因对仔鼠小脑重的影响

Fig 2 Effect of heroin on cerebellar weight of newborn mice

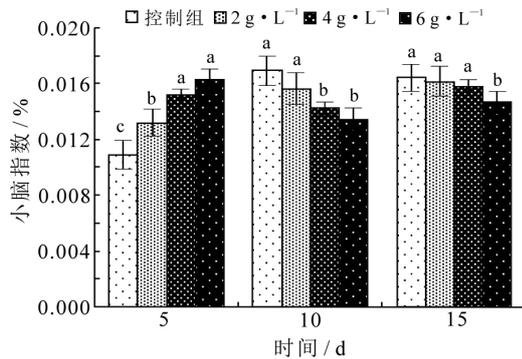


图 3 海洛因对仔鼠小脑指数的影响

Fig 3 Effect of heroin on cerebellar index of newborn mice

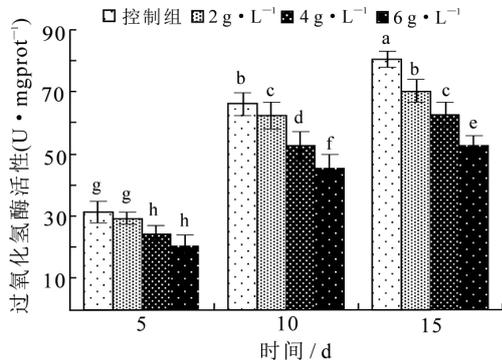


图 4 海洛因对仔鼠小脑组织过氧化氢酶活性的影响

Fig 4 Effect of heroin on activity of cerebellar CAT in newborn mice

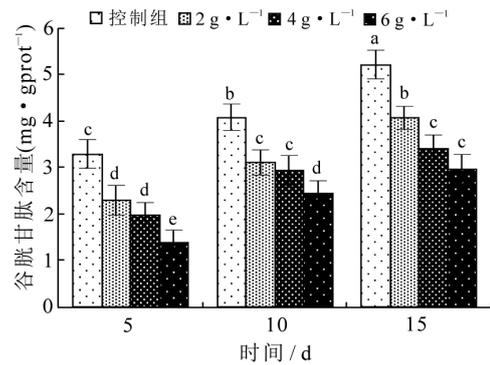


图 5 海洛因对仔鼠小脑组织谷胱甘肽含量的影响

Fig 5 Effect of heroin on content of cerebellar GSH in newborn mice

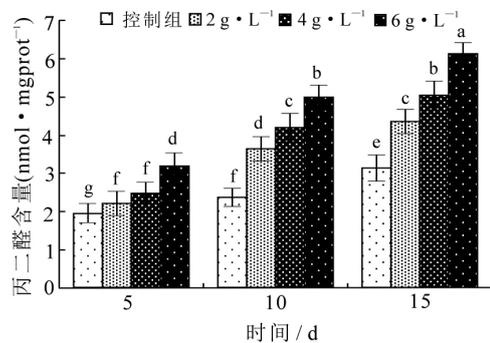
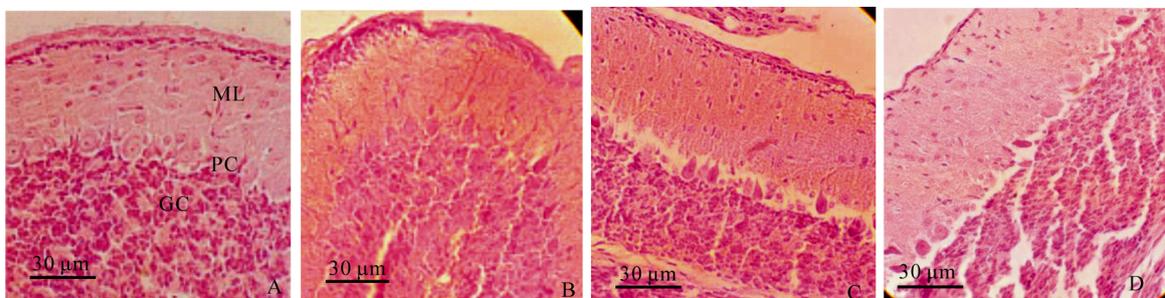


图 6 海洛因对仔鼠小脑组织丙二醛含量的影响

Fig 6 Effect of heroin on content of cerebellar MDA in newborn mice

### 2.3 仔鼠小脑组织结构的变化

给孕鼠注射海洛因后对仔鼠小脑组织结构的影响见图 7。研究结果显示，对照组仔鼠小脑组织结构完整清晰，界限分明，细胞排列整齐，染色正常(图 7A)。孕鼠连续注射海洛因后，仔鼠小脑组织出现不同程度的病理性变化，细胞排列疏松而凌乱，细胞界限不清，浦肯野细胞形态不规则，出现细胞核固缩、凝集等异常改变或细胞空泡化和凋亡等现象(图 7B~D)。



A. 对照组 10 d 小脑皮层，HE 染色，下同；B. 2 g·L<sup>-1</sup> 海洛因组 10 d 小脑皮层；C. 4 g·L<sup>-1</sup> 海洛因组 10 d 小脑皮层；D. 6 g·L<sup>-1</sup> 海洛因组 15 d 小脑皮层，标尺 = 30 μm；ML. 分子层；PC. 浦肯野细胞层；GC. 颗粒细胞层，标尺 = 30 μm

图 7 仔鼠小脑组织结构的变化

Fig 7 The changes of cerebellum histological structure in newborn mice

### 3 讨论

#### 3.1 海洛因对仔鼠小脑重、体重及小脑指数的影响

小脑参与调节躯体平衡和肌肉张力、协调机体的随意运动,如果损伤小脑,机体就会出现供给失调、步态不稳等多种症状<sup>[6]</sup>,海洛因作用于阿片受体通过释放内源性阿片样物质或形成复合物,可造成脑部多个区域损伤<sup>[7]</sup>.长期使用兴奋剂机体内分泌系统及其功能将受到极大的影响,激素分泌受到抑制,造成机体生长迟缓<sup>[7]</sup>,影响动物下丘脑摄食中枢的发育及功能,影响动物的食欲,导致食量减少,影响机体的发育和体重及器官重量<sup>[8]</sup>.本实验各期海洛因组仔鼠体重和小脑重均低于对照组,可能是因为海洛因通过胎盘屏障或乳汁进入仔鼠体内,再通过血脑屏障,直接作用于发育中的神经细胞,影响神经细胞的发育和仔鼠的行为,导致小鼠兴奋性增强,疲劳感消失,睡眠减少,活动量加大,增加了机体物质的消耗,使得动物生长迟缓,海洛因的毒性作用亦可能干扰了体内能量代谢过程,造成代谢紊乱<sup>[9]</sup>,影响动物的食欲,使得动物营养物质摄入不足,导致体重和器官重量下降及器官指数下降.

#### 3.2 海洛因对仔鼠小脑抗氧化酶的影响

生物体在代谢过程中会产生大量的超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )等活性氧,正常情况下机体内的这些活性氧处于生成与清除的动态平衡状态,如果由于某种因素将这一平衡打破时,活性氧的生成增多或清除速率减慢,导致活性氧浓度升高并超过生理限度,就会影响体内氧化还原体系的平衡状态,造成生物大分子的氧化损伤<sup>[10]</sup>,发生脂质过氧化破坏生物膜的完整性<sup>[11]</sup>,使蛋白质肽链交联和酶变性失活<sup>[12]</sup>、DNA 链断裂、多糖氧化、基因突变等<sup>[13]</sup>,进而引起生物体各种生理病变,导致细胞老化、死亡.

GSH、CAT 是机体抗氧化系统的重要组成部分.CAT 具有清除氧自由基、保护细胞免受氧化损伤的作用,GSH 可与  $H_2O_2$  反应生成  $H_2O$ ,通过减少  $H_2O_2$  含量来消除  $\cdot OH$  的生成,对机体细胞结构和功能完整有重要的保护作用.MDA 是脂质过氧化反应过程中不饱和脂肪酸氧化分解释放出的反应性醛,可严重破坏细胞膜结构,导致细胞肿

胀、坏死,其含量的高低反映机体细胞遭受自由基攻击的程度<sup>[14]</sup>.海洛因、可卡因及安非他明等可诱导细胞凋亡的发生,引起神经细胞变性、坏死<sup>[7,15,16]</sup>.有研究显示麻黄素可使肺组织<sup>[17]</sup>、心肌细胞<sup>[18]</sup>、肝<sup>[19]</sup>、卵巢<sup>[20]</sup>、肾<sup>[21]</sup>组织发生脂质过氧化损伤使组织中的抗氧化酶活性降低,MDA 含量升高.本实验结果显示,给孕鼠注射海洛因后仔鼠小脑组织 CAT 活力和 GSH 含量下降,MDA 含量上升,表明孕鼠注射海洛因影响仔鼠小脑组织的抗氧化能力,会影响小脑的结构与功能.

#### 3.3 海洛因对仔鼠小脑组织结构的影响

海洛因可与体内内源性阿片样物质竞争结合阿片受体,如果长时间使用海洛因会导致机体兴奋剂依赖.海洛因可通过血脑屏障,直接抑制呼吸中枢,造成机体呼吸抑制,导致机体缺氧,出现全身缺血缺氧,促使机体器官损伤,损害脑细胞,影响人的学习、记忆、情感、情绪等功能活动<sup>[22-24]</sup>,有研究显示麻黄素可使小鼠下丘脑、海马<sup>[25]</sup>、大脑额叶<sup>[26]</sup>组织结构受损.本实验显示孕鼠注射海洛因影响仔鼠的体重和小脑重量及小脑指数,仔鼠小脑组织出现不同程度的病理性变化,细胞排列疏松而凌乱,细胞界限不清,浦肯野细胞形态不规则,出现细胞核固缩、凝聚等异常改变或细胞空泡化和凋亡现象等,这可能是孕鼠注射海洛因后,后者通过胎盘屏障或乳汁进入仔鼠体内影响了仔鼠脑的结构与功能,表明母鼠使用海洛因影响仔鼠小脑的组织结构.

综上所述,母鼠注射海洛因,可能通过胎盘屏障或乳汁进入仔鼠体内,再通过血脑屏障,直接作用于发育中的神经细胞,使仔鼠机体重量、器官重量及器官指数降低,影响仔鼠脑组织抗氧化酶活性,对仔鼠脑组织有明显的损伤作用,其具体机制有待进一步研究和探讨.

#### 参考文献:

- [1] 金莎丽,郝清华,姚玉红,等.海洛因与脑损害[J].现代预防医学,2005,32(2):158.
- [2] VOGEL K S. Development of trophic interactions in the vertebrate peripheral nervous system [J]. *Molecular Neurobiology*, 1993, 7(3/4): 363.
- [3] SANDOR S, MIC A F. Cell death in normobaric and teratogenesis. II. Cell death in teratogenesis [J]. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 1994, 40(3/4): 83.

- [4] 李重阳,高先军,王昱,等.海洛因、麻黄素对仔鼠下丘脑、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.
- [5] 岳东旭,池宏伟,鹿双双,等.发表文献中小鼠安死术方法的分析研究(2015—2016)[J].中国比较医学杂志,2017,27(11):91.
- [6] 熊飞,朱兰兰,严汉英,等.褪黑素减轻丙烯酰胺对大鼠小脑的氧化损伤作用[J].毒理学杂志,2013,27(1):23.
- [7] 刘徽婷,王嘉军.海洛因依赖者神经-内分泌-免疫功能损伤[J].中国药物依赖性杂志,2009,18(1):10.
- [8] 张志岐,束刚,江青艳.下丘脑对脂类的营养感应及其参与食欲调控的机制[J].动物营养学报,2013,25(7):1395.
- [9] TILSON H A, SQUIBB R E. The effects of acrylamide on the behavioral suppression produced by psychoactive agents [J]. *Neurotoxicology*, 1982, 3(1): 113.
- [10] HE Z W. A revision of the genus *Craspedacusta* in China (limnoeudae, olindidae) [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2003, 28(1): 20.
- [11] CHEN C A, WILLIS B L, MILLER D J. Systematic relationships between tropical corallimorpharians (Cnidaria: Anthozoa: Corallimorpharia): Utility of the 5.8 s and internal transcribed spacer (ITS) regions of the rRNA transcription units[J]. *Bulletin of Marine Science-Miami*, 1996, 59(1): 196.
- [12] ODORICO D M, MILLER D J. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8s rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 1997, 14(5): 465.
- [13] OPPEN M J, WILLIS B L, VUGT H W, et al. Examination of species boundaries in the *Acropora cervicornis* group (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, 9(9): 1363.
- [14] 陈永兰,农文田,颜小芳,等.川芎对衰老小鼠超氧化物歧化酶和丙二醛及羟自由基的影响[J].中外医学研究,2012,10(4):7.
- [15] 刘蓉予,苏家麟,于常海.神经系统与细胞凋亡[J].生理科学进展,1999,30(2):173.
- [16] LEIST M, NICOTERA P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 239(2): 183.
- [17] 彭静,李重阳,刘婷婷,等.麻黄素对小鼠肺组织结构的影响[J].解剖学报,2016,47(4):521.
- [18] 刘婷婷,彭静,李重阳,等.麻黄素对小鼠心肌组织结构和总抗氧化能力、过氧化氢酶活力的影响[J].解剖学报,2016,47(4):516.
- [19] 李波阳,安晶晶,俞诗源.母鼠注射麻黄素对仔鼠肝组织结构和总抗氧化能力、谷胱甘肽转移酶活性及丙二醛含量的影响[J].解剖学杂志,2017,40(2):137.
- [20] 刘小媛,李重阳,俞诗源,等.麻黄素对卵巢组织结构的影响[J].解剖学报,2014,45(3):398.
- [21] 王锦锦,李重阳,俞诗源,等.麻黄素对仔鼠肾组织结构和SOD、CAT活力及MDA含量的影响[J].动物学杂志,2011,46(6):118.
- [22] 李利华,冯忠堂.20例海洛因成瘾死亡者组织病理变化观察[J].昆明医科大学学报,2001,22(1):1.
- [23] 姚凤升,于建云,瞿勇强.15例海洛因毒瘾死者组织病理学研究[J].中国法医学杂志,1994,9(2):104.
- [24] 杨爱霞,王嘉军,刘志亮,等.海洛因成瘾者血中神经肽类物质和细胞因子的变化[J].中国药物依赖性杂志,2000,9(2):113.
- [25] 王昱,李重阳,俞诗源,等.注射海洛因、麻黄素对仔鼠大脑颞叶皮层结构及学习记忆能力的影响[J].解剖学报,2009,40(5):724.
- [26] 俞诗源,陈琛.中药复方对麻黄素成瘾小鼠大脑额叶结构的影响[J].西北师范大学学报(自然科学版),2013,49(2):84.

(责任编辑 陆泉芳)