

75% 200、400、600 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 分别作用 4 d 时,Erk 磷酸化水平亦逐渐降低,400 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 作用 4 d 时较对照明显降低了 78%,表明 MnCl_2 对 PC12 细胞 ERK 激活的抑制作用呈浓度和时间依赖效应。结果提示锰致 PC12 细胞增殖抑制为细胞凋亡,可能与 Erk 磷酸化水平的降低有关。

参考文献

- (1) Bornhorst J, Ebert F, Hartwig A, et al. Manganese inhibits poly (ADP-ribose) ation in human cells: a possible mechanism behind manganese-induced toxicity [J]. *Environ Monit*, 2010, 12 (11): 2062 - 2069.
- (2) 黄波, 吴训伟, 王清海. PAS - Na 治疗锰中毒大鼠中枢神经系统病变的观察 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1994, 12 (4): 205.
- (3) Verhoeven WM, Egger JI, Kuijpers HJ. Manganese and acute paranoid psychosis: a case report [J]. *Med Case Reports*, 2011, 1 (12), 5: 146.
- (4) 于燕, 张瑞娟, 张敬华. 姜黄素对香烟主流烟气凝聚物诱变性的拮抗作用 [J]. *中国公共卫生*, 2003, 19 (5): 538 - 540.
- (5) 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版公司,

- 1996: 127 - 143.
- (6) Williams BB, Kwakye GF, Wegrzynowicz M, et al. Altered manganese homeostasis and manganese toxicity in a Huntington's disease striatal cell model are not explained by defects in the iron transport system [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 117 (1): 169 - 179.
- (7) 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 898 - 900.
- (8) Pohl HR, Roney N, Abadin HG. Metal ions affecting the neurological system [J]. *Met Ions Life Sci*, 2011, 8: 247 - 262.
- (9) Martin WR. Fuming over Parkinson disease: are welders at risk? [J]. *Neurology*, 2011, 76 (15): 1286 - 1287.
- (10) Prabhakaran K, Chapman GD, Gunasekar PG. α -Synuclein overexpression enhances manganese-induced neurotoxicity through the NF- κ B-mediated pathway [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2011, 21 (6): 435 - 443.
- (11) Molina RM, Phattanarudee S, Kim J, et al. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring [J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32 (4): 413 - 422.

收稿日期: 2010-12-18

(宋艳萍编辑 韩仰欢校对)

【实验研究】

剖宫产仔鼠行为认知能力与 nNOS 表达变化*

胡志英¹, 王静², 黄检英², 李燕², 吴林珍¹, 刘玲¹, 方马荣²

摘要:目的 探讨剖宫产出生仔鼠行为认知能力和脑型一氧化氮合酶(neural nitric oxide synthase, nNOS)表达变化。方法 妊娠大鼠随机分为 2 组:阴道产和剖宫产组;剖宫产组于孕 21 d 剖宫取仔鼠。对出生后 30 和 115 d 的仔鼠先行 Morris 水迷宫行为学测试,并分别于出生 7、30 和 115 d 后处死仔鼠,免疫组化检测额叶皮质、海马和纹状体中 nNOS 表达。结果 行为学测试:出生 115 d 成年鼠的逃避潜伏期阴道产组为(19.36 ± 10.51) s,低于剖宫产组的(30.51 ± 14.11) s ($P < 0.05$);免疫组化结果显示:出生 30 d 幼鼠额叶皮质的 nNOS 阳性细胞剖宫产组(3.60 ± 2.07)高于阴道产组(1.20 ± 0.45) ($P < 0.05$),海马中剖宫产组(5.80 ± 1.79)明显高于阴道产组(1.20 ± 0.45) ($P < 0.001$),纹状体中阴道产组(0)明显少于剖宫产组(21.4 ± 9.13) ($P < 0.001$);出生 115 d 成年鼠海马中的 nNOS 阳性细胞阴道产组(2.00 ± 0.71)低于剖宫产组(3.80 ± 1.48) ($P < 0.05$)。结论 剖宫产仔鼠幼年皮质、纹状体 nNOS 表达上调在成年后恢复正常,但在海马中则持续到成年后,并引起行为认知能力异常,提示剖宫产对仔鼠海马区造成影响可能更持久,并使与海马相关的空间记忆和学习能力受到损害。

关键词:剖宫产;水迷宫;一氧化氮合酶;脑型一氧化氮合酶

中图分类号: R 715.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0053-03

Behavioral alterations and changes of nNOS expression in brain of offspring rats born by cesarean section HU Zhi-ying, WANG Jing, HUANG Jian-ying, et al. *Department of Obstetrics and Gynecology, Hangzhou Red Cross Hospital, Zhejiang Province (Hangzhou 310003, China)*

Abstract: Objective To explore the potential behavioral alterations in the Morris water maze test and the changes of neural nitric oxide synthase (nNOS) expression in the brain of offspring rats born by cesarean section. **Methods** The pregnant rats were randomly allocated into vaginal delivery and cesarean section groups. Fetuses were delivered by cesarean section on day 21 of the gestation. Morris water maze tests were performed on postnatal day 30 and 115. Then the offspring rats were sacrificed and their brain tissues were collected on postnatal day 7, 30 and 115. Using immunohistochemical staining, the expressions of nNOS in the cortex of frontal lobe, hippocampus and corpora striatum were detected. **Results** Morris water maze results showed that the escape latency of the offspring rats on postnatal day 115 in vaginal delivery group was significantly shorter than that of cesarean group (19.36 ± 10.51 s vs 30.51 ± 14.11 s, $P < 0.05$). Immunohistochemical staining manifested that the density of nNOS positive cells in frontal cortex of 30-day-old offspring rats in cesarean section group (3.60 ± 2.07) was higher than that of vaginal delivery group (1.20 ± 0.45) ($P < 0.05$). The density of nNOS positive cells in the hippocampus in vaginal delivery group was significantly fewer than that of cesarean section group (1.20 ± 0.45 vs 5.80 ± 1.79, $P < 0.001$). The density of nNOS positive cells within the corpora striatum in vaginal delivery group (0 ± 0)

* 基金项目: 杭州市医药卫生重点项目(2006Z006)

作者单位: 1. 杭州市红十字会医院妇产科, 浙江 310003; 2. 浙江大学医学院

作者简介: 胡志英(1966 -), 女, 浙江杭州人, 主任医师, 双学士, 从事妇产科临床和生殖学研究工作。

was significantly lower than that of cesarean section group (21.4 ± 9.13) ($P < 0.001$). In the offspring rats of 115-day-old, the density of nNOS positive cells in the hippocampus of vaginal delivery group (2.00 ± 0.71) were fewer than that of cesarean group (3.80 ± 1.48) ($P < 0.05$). **Conclusion** The upregulated expression of nNOS in the cortex, corpora striatum of offspring rats born by cesarean section might revert to normal in adulthood. The abnormal nNOS expression in hippocampus will remain even in adulthood and results in the abnormality of behavior cognitive ability. The results indicate that cesarean delivery could impact hippocampus region persistently and impair the spatial memory and learning ability related to hippocampus in rats.

Key words: caesarean section; water maze; nitric oxide synthase (NOS); neural nitric oxide synthase (nNOS)

优生优育是中国的一项基本国策。近年来,国内外剖宫产率逐年上升,剖宫产术对子代脑发育的潜在影响已引起关注。研究表明,剖宫产分娩对子代脑发育和脑功能可能产生持续影响,使仔鼠成年时应急条件下的多巴胺功能调节方式出现改变^[1-3]。还有研究采用韦氏儿童智力量表测试儿童的智商,发现不同分娩方式对儿童智力有不同程度的影响^[4]。一氧化氮(nitric oxide, NO)在中枢神经系统中具有重要作用,与脑神经元发育及学习记忆过程密切相关。但 NO 在体内的半衰期仅 3~5 s,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)作为 NO 合成的唯一限速酶则成为人们关注的焦点^[5]。本研究于 2007 年 6 月-2009 年 6 月,通过 Morris 水迷宫行为学测试,免疫组化检测脑型一氧化氮合酶(neural nitric oxide synthase, nNOS)在仔鼠额叶皮质、海马及纹状体内的表达变化,探讨剖宫产术对子代脑发育可能产生的影响,为降低剖宫产率、提高出生人口的素质、进一步促进和支持自然分娩提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 动物分组与处理 实验动物为 4 月龄体质量为 (250 ± 20) g 的 SD 健康雌性大鼠 60 只和体质量为 (350 ± 30) g 的健康雄鼠 20 只(浙江大学医学院实验动物中心提供,SYXK(浙)2004-0052 号)。实验前饲养 2 周以适应实验室环境。将大鼠按雌雄比例 3:1 合笼后,每天进行阴道涂片检查,查出精子定为妊娠第 0 d,孕鼠 38 只随机分为 2 组:阴道产组和剖宫产组各 19 只。阴道产组不进行任何处理,剖宫产组于孕 21 d 剖宫取仔鼠,为排除体质量及性别差异对仔鼠脑发育的影响,各组仅选择体质量 > 5g 的雄性仔鼠,标记后由代理母亲哺乳 8~10 只一窝。选取 2 组仔鼠各 68 只,其中 20 只阴道产组仔鼠和 28 只剖宫产组仔鼠于出生 7 d 后处死;其余 48 只阴道产组仔鼠和 40 只剖宫产组仔鼠分别于出生后 30 和 115 d 进行水迷宫测试后再处死。

1.2 试剂与仪器 一抗:nNOS 抗体(兔抗,美国 SantaCruz 公司);DAKO EnVision 试剂盒和二氨基联苯胺显色试剂盒(丹麦 DAKO 公司);石蜡切片机(上海仙申医教仪器厂 X-202B 型转轮式切片机);数显恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司 HH-8);光学显微镜(日本尼康公司 E600);水迷宫测试仪(荷兰 NOLDUS 公司 EthoVision 动物轨迹记录分析系统);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 Morris 水迷宫行为学检测 参照 Morris water maze 法^[6]对大鼠进行空间记忆的训练和测试,用 Morris 水迷宫检测的逃避潜伏期反映大鼠空间记忆的获得情况,即检测空间学习记忆能力。水温保持在 25℃ 左右,平台为透明有机玻璃。实验过程中周围环境条件保持安静、稳定。实验分为训练期和测试期。1~4 d 为训练期,每天上、下午各训练 1 次。训练时,将大鼠沿壁轻放入水中。记录大鼠的逃避潜伏期:即从大鼠入水到找到水下平台所需要的时间。若大鼠 120 s 内

未找到平台,则引导大鼠找到平台,逃避潜伏期以 120 s 计。大鼠找到平台或被引导到平台上后停留 10 s。然后擦干放回笼内。第 2 天的训练较第 1 天前进 1 个象限入水,依此类推。第 5 d 为测试期,上、下午测试记录大鼠的逃避潜伏期,取 2 次测试记录的平均值。

1.4 免疫组化法检测 NOS 在各组仔鼠脑内的分布和表达

1.4.1 组织获取 各组仔鼠经腹腔注射 7% 水合氯醛(35 mg/100 g 体重)麻醉后,经左心室灌注生理盐水 100 mL,继续灌注约 300 mL 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液。开颅取脑后固定于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中,常规石蜡包埋切片,切片厚度为 5 μ m。

1.4.2 免疫组化染色 (1) 石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精至水,0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液漂洗后。(2) 置于加有 0.01 mol/L pH 6.0 枸橼酸缓冲液的抗原修复杯中,微波炉中火修复 10 min,0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液漂洗 5 min \times 3。(3) 用 3% H_2O_2 的甲醇溶液室温孵育切片 20 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。(4) 切片经磷酸盐缓冲液漂洗后,孵育于包含 0.3% Triton x-100 和 10% 正常山羊血清的磷酸盐缓冲液中进行封闭,37℃ 30 min。(5) 加一抗(nNOS 1:300,兔抗),湿盒中 4℃ 孵育过夜。切片用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液振荡洗涤 5 min \times 3,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗工作液(DAKO EnVision 试剂盒),37℃ 孵育 120 min;0.01 mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液漂洗。采用二氨基联苯胺显色试剂盒,室温下显色。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。用磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.4.3 光学显微镜下观察 胞浆为棕黄色者为阳性免疫反应。高倍视野下($\times 400$) 每张切片于额叶皮质、海马和纹状体区选取 5 个随机视野,记录阳性细胞数。利用 Leica QWin 图象分析软件记录单位面积阳性细胞数。

1.5 统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 不同组别大鼠逃避潜伏期比较(表 1) 2 组出生 30 d 幼鼠逃避潜伏期差异无统计学意义($t = 1.241, P = 0.208$);出生 115 d 成年鼠,阴道产组逃避潜伏期短于剖宫产组,差异有统计学意义($t = 3.164, P = 0.006$)。

表 1 不同组别大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	30 d		115 d	
	动物数	潜伏期(s)	动物数	潜伏期(s)
阴道产	29	25.88 \pm 8.87	19	19.36 \pm 10.51
剖宫产	21	32.33 \pm 18.35	19	30.51 \pm 14.11 ^a

注:与阴道产组比较 ^a $P < 0.01$ 。

2.2 nNOS 免疫阳性细胞的形态和分布 nNOS 阳性反应细胞呈棕黄色,阳性产物集中于胞浆、突起和部分神经纤维,胞

核不着色;胞体多数呈圆形或卵圆形。免疫阳性细胞在额叶皮质和海马区分布不集中,而在纹状体中分布较集中。

2.3 nNOS 免疫阳性细胞的数目变化(表 2) 出生 7 d 仔鼠阴道产组和剖宫产组中 nNOS 阳性细胞广泛分布在额叶皮质,海马也可见少量分布 2 组差异无统计学意义。出生 30 d

幼年仔鼠额叶皮质、海马、纹状体中 nNOS 阳性细胞数剖宫产组均高于阴道产组,差异有统计学意义。出生 115 d 成年仔鼠海马中 nNOS 阳性细胞数阴道产组少于剖宫产组,差异有统计学意义外,其他部位 2 组差异无统计学意义。

表 2 出生后不同发育阶段仔鼠不同部位 nNOS 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	30 d				115 d			
	动物数	额叶皮质	海马	纹状体	动物数	额叶皮质	海马	纹状体
阴道产	29	1.20 ± 0.45	1.20 ± 0.45	0 ± 0	19	1.60 ± 1.34	2.00 ± 0.71	16.60 ± 8.96
剖宫产	21	3.60 ± 2.07	5.80 ± 1.79	21.4 ± 9.13	19	2.20 ± 0.45	3.80 ± 1.48	18.20 ± 7.26
F 值		6.40	31.12	27.49		0.90	6.00	0.10
P 值		0.035	0.000	0.000		0.371	0.040	0.764

3 讨论

中国剖宫产率近 50%, 为世界第一, 远超过警戒线 15%, 适宜的剖宫产对保障母婴安全起较大作用, 但当剖宫产率达到 20% 以后, 围产儿死亡率不再明显下降⁽⁷⁾。不断上升的剖宫产率, 引起专家们的关注⁽²⁻¹³⁾。近年来, 剖宫产率逐年上升, 除产科原因外, 社会因素居首位⁽⁹⁻¹²⁾, 已成为当前产科和公共卫生的重要问题。有文献报道, 剖宫产对婴儿的智能发育影响有迟发效应, 可能导致中枢神经系统神经递质紊乱, 使童年和成年期精神神经疾病发生的危险性增加, 是影响儿童多动症发生的危险因素之一⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。

本研究结果表明, 出生 30 d 幼年仔鼠逃避潜伏期剖宫产与阴道产组差异无统计学意义; 而 2 组 115 d 成年仔鼠差异有统计学意义, 提示剖宫产可能干扰了成年仔鼠学习和记忆的获得与巩固过程, 发生了空间学习记忆障碍。NO 作为逆行的反馈信使分子, 参与学习记忆等过程⁽¹⁷⁻¹⁸⁾。不同的 NOS 合成的 NO 具有不同作用, nNOS 产生的 NO 作为信使分子在神经元信号传递中起重要作用^(5, 19)。nNOS 的激活可作为一个重要介导因素引起神经元的毒性作用, 引起神经元的凋亡或细胞的变性坏死⁽²⁰⁾。海马是大脑的重要结构, 在学习记忆、情感反应等活动中起重要作用, 并参与记忆的获得、巩固和保留。本研究发现, 阴道产和剖宫产组的 nNOS 阳性细胞在出生 30 d 幼鼠的额叶皮质、海马及纹状体中虽均有差异, 但行为学检测无差异; 而海马区 nNOS 表达上调持续至出生后 115 d, 且与行为学测试结果趋势一致, 提示剖宫产对在学习记忆中起重要作用的海马区造成影响可能更持久, 从而影响动物成年后的空间学习和记忆能力。

针对我国畸高的剖宫产率, 2010 年中国妇幼保健协会启动了“促进自然分娩, 保障母婴安康”项目, 从国家层面通过系列措施给剖宫产“降温”。降低剖宫产率尚需全社会共同努力。

参考文献

- (1) Boksa P, El-Khodori BF. Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2003, 27(1-2): 91-101.
- (2) Seeman P, Schwarz J, Chen JF, et al. Psychosis pathways converge via D2 high dopamine receptors [J]. *Synapse* 2006, 60(4): 319-346.
- (3) Boksa P, Zhang Y. Epinephrine administration at birth prevents long-term changes in dopaminergic parameters caused by cesarean

- section birth in the rat [J]. *Psychopharmacology*, 2008, 200(3): 381-391.
- (4) 王秀丽, 宋宝才. 多动症儿童认知功能对照研究 [J]. *中华实用中西医杂志* 2004, 17(17): 2676-2677.
- (5) Karolewicz B, Szebeni K, Stockmeier CA, et al. Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression [J]. *J Neurochem*, 2004, 91(5): 1057-1066.
- (6) Gilbert ME, Mundy WR, Crofton KM. Spatial learning and long-term potentiation in the dentate gyrus of the hippocampus in animals developmentally exposed to aroclor 1254 [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 57(1): 102-111.
- (7) 王玉玲, 郭晓玲, 其木格. 降低剖宫产率临床措施的初步探讨 [J]. *中国妇幼保健研究* 2009, 20(5): 538-539.
- (8) Souza J, Gülmezoglu A, Lumbiganon P, et al. The WHO Global Survey on Maternal and Perinatal Health Research Group. Caesarean section without medical indications is associated with an increased risk of adverse short-term maternal outcomes: the 2004-2008 WHO Global Survey on Maternal and Perinatal Health [J]. *BMC Med*, 2010, 8: 71.
- (9) 宋波, 方利文, 周钰, 等. 妊娠妇女社会因素剖宫产状况及影响因素分析 [J]. *中国公共卫生* 2010, 26(5): 533-534.
- (10) 李晓燕, 吴耀春, 汪涛, 等. 中国妇女剖宫产率及其影响因素 [J]. *中国公共卫生* 2006, 22(1): 1-2.
- (11) 郭素芳, 赵凤敏, 吴匡时, 等. 1971 年至 2003 年我国剖宫产率变化趋势及社会人口学影响因素的研究 [J]. *中华围产医学杂志* 2005, 8(3): 145-149.
- (12) 校勤, 郭靖. 剖宫产率及指征变化的临床分析 [J]. *国外医学: 妇幼保健分册* 2005, 16(3): 133-134.
- (13) 戴淑凤. 剖宫产与感觉统合失调 [J]. *中国全科医学* 2003, 6(8): 626-627.
- (14) 唐智超. 分娩方式对 6 个月内婴儿健康、智能发育影响的初步研究 [J]. *中国现代医生* 2007, 45(9): 44-45.
- (15) 毛新丽, 静进. 不同原因剖宫产对儿童认知特点的影响 [J]. *白求恩医学院学报* 2005, 3(4): 231-232.
- (16) 高宇, 邓小虹. 孕期和分娩因素与儿童多动症的相关性 [J]. *中国妇幼保健* 2008, 23(14): 1935-1937.
- (17) Ledo A, Frade J, Barbosa RM, et al. Nitric oxide in brain: diffusion targets and concentration dynamics in hippocampal subregions [J]. *Mol Aspects Med*, 2004, 25(1-2): 75-89.
- (18) Keynes RG, Garthwaite J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury [J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(2): 179-191.
- (19) Weitzdoerfer R, Hoeger H, Engidawork E, et al. Neuronal nitric oxide synthase knock out mice show impaired cognitive performance [J]. *Nitric Oxide* 2004, 10(3): 130-140.
- (20) Katsuki H, Yamamoto R, Nakata D, et al. Neuronal nitric oxide synthase is crucial for ganglion cell death in rat retinal explant cultures [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 94(1): 77-80.