

雌鼠摄入咖啡因对妊娠和仔鼠神经反射能力的影响^{*}

李明阳^{**}, 马春霞, 陈香岭, 杨 渊, 杨筱舟, 俞建昆^{***}

(中国医学科学院医学生物学研究所 中心实验室, 云南 昆明 650118)

[摘要] 目的: 了解雌鼠因摄取咖啡因对胎鼠体质量及对仔鼠神经反射功能的影响。方法: 成年昆明小鼠100只, 雌雄按4:1随机合笼, 分为高、中及低实验组和对照组; 实验组雌鼠分别给予100、25及6.25 mg/(kg·d)剂量咖啡因灌胃, 对照组雌鼠给予等量双蒸水灌胃至孕鼠生产前; 观察每组雌鼠生活状态, 记录非受孕雌鼠合笼25 d的体质量、5个发情周期内受孕雌鼠数量及产仔数量, 并于仔鼠出生1周时观察的仔鼠外形畸形情况及翻正实验达标时间。结果: 与对照组比较, 高、中实验组雌鼠的体质量增长率降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与对照组比较, 随着咖啡因的摄入剂量增加, 雌鼠受孕率、产仔数降低, 死胎数和死胎率增加; 高、中、低剂量组雌鼠受孕率低于对照组, 死胎数及死胎率高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 高剂量组产仔数低于对照组($P < 0.05$), 仔鼠出生1周时未见外形畸形; 高、中剂量组仔鼠平面翻正反射达标时间显著高于低剂量组和对照组($P < 0.01$)。结论: 雌鼠孕前和孕期摄入咖啡因可明显抑制体质量增长并导致怀孕率下降、死胎率升高, 且能一定程度的降低仔鼠神经反射能力。

[关键词] 小鼠, 昆明; 咖啡因; 怀孕期间; 胚胎发育; 流产, 自然; 神经反射

[中图分类号] R114 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)05-0518-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.05.005

Effects of Female Rat Caffeine Intaking on Pregnancy and Nerve Reflex of Fetal Rat

LI Mingyang, MA Chunxia, CHEN Xiangling, YANG Yuan, YANG Xiaozhou, YU Jiankun

(Central laboratory, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union

Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of female rats caffeine intaking on fetal development and nerve reflex of fetal rat. **Methods:** 100 healthy adult KM rats, female: male = 4:1, were cohabited and divided into 4 groups randomly (high, medium, low experiment groups and control groups), 5 cages of each group. The experiment female rats were given 100, 25 and 6.25 mg/(kg·d) dosage caffeine for irrigation, while control group female rats were given equal volume of double distilled water for irrigation until childbirth. Observing the life state of the rats, recording the weight of female rats in the first 25 days, the number of the pregnant rats and the newborn rats in five estrus cycle. At 1st week of fetal rats, observing deformity and righting reflex test. **Results:** Comparing with the control group, the female rats of high and medium dose group had lower weight growth rate($P < 0.05$ or $P < 0.01$); comparing with control group, with the increment of caffeine dosage, pregnancy rate and new born rate were decreased while dead embryo number and fetal death rate were increased; pregnancy rate of high, medium and low dosage group female rats were lower than control group, dead embryo number and fetal death rate were higher than control group($P < 0.05$ or $P < 0.01$); new born numbers of high dos-

^{*} [基金项目] 中国医学科学院重大协同创新项目(2016-12M-001)

^{**} 中国医学科学院医学生物学研究所 2016 级硕士研究生

^{***} 通信作者 E-mail: yjk@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2017-5-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170518.2227.009.html>

age group were lower than control group ($P < 0.05$); fetal rats were not observed with deformity after 1 week of birth; high and medium dosage group fetal rats righting reflex time was obviously higher than low dosage group and control group ($P < 0.01$). **Conclusions:** Female rats ingesting caffeine during pregnancy and before can obviously inhibit weight gain, decreasing pregnancy rate, increasing stillbirth rate and reducing the ability of nerve reflex to a certain degree.

[Key words] mice, Kunming; caffeine; during pregnancy; embryonic development; abortion, nature; nerve reflex

咖啡因是一种温和的神经兴奋剂,具有兴奋心脏、舒张血管、缓解疲劳等作用,因此人们经常通过饮用含有咖啡因的饮品咖啡、可乐、茶等来放松精神或提高工作和学习的效率^[1]。但咖啡因的持续摄入亦可对人类健康构成威胁,早在 1996 年就有国外学者指出,妊娠期女性的咖啡因摄入量与新生儿出生体重呈负相关^[2-3]。咖啡因作为一种高脂溶性物质,怀孕女性饮用后,极易通过胎盘屏障到达胎儿体内^[4],且胎儿可通过吞饮羊水摄取、并被胎儿胃肠道少量吸收,最终分布于胎儿的肝脏、心脏等脏器或脑组织中,在该时期咖啡因对神经系统和脑组织的微小损害,哪怕只是对少量细胞的损伤,都会通过发育进程逐步放大,最终对新生儿产生终生的影响。因此,女性在孕前和孕期持续摄入咖啡因,对胎儿生长发育的影响可能远大于对母体本身的影响。本研究以雌性昆明小鼠作为研究对象,通过孕前和孕期对其进行不同剂量的咖啡因灌胃处理,探究咖啡因是否影响胎鼠发育及仔鼠的神经反射行为。

1 材料与方法

1.1 实验动物、仪器及试剂

实验动物为 100 只成年昆明小鼠,体质量(28 ± 5)g,雌:雄=4:1。适应性饲养 1 周后随机合笼,分为咖啡因高、中、低剂量实验组和对照组,每组重复 5 笼,每笼雌:雄=4:1,实验期间小鼠均按时给予充足的食物和干净的饮用水,每周换置干净垫料 2~3 次。主要仪器有电子天平(MP6001)、灌胃针、1 mL 注射器、50 mL 塑料细胞培养瓶、封口膜(由医学生物学研究所中心实验室提供),试剂有咖啡因(北京赛珂玛生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 咖啡因溶液配置 根据高、中、低实验组小鼠分别给予 100、25 及 6.25 mg/(kg·d)剂量的咖

啡因灌胃,计算得出高、中、低 3 个剂量咖啡因浓度为 20、5 及 1.25 g/L。3 个剂量分别配制 100 mL,用电子天平分别称量 2、0.5、0.125 g 咖啡因粉末,置于烧杯中,用适量蒸馏水溶解,定容至 100 mL 即得,将配制好的不同浓度咖啡因置于 50 mL 塑料细胞培养瓶中储存,封口膜封口,贴好标签,常温下备用。

1.2.2 雌鼠体质量测定及灌胃 从合笼第 2 天开始,每天同一时间段,按预先编号顺序记录雌鼠体质量并灌胃。高、中、低实验组小鼠分别给予 100、25 及 6.25 mg/(kg·d)剂量的咖啡因灌胃。对照组雌鼠给予等量的双蒸水灌胃。

1.2.3 受孕率、体质量增长率及死胎率 实验期间,每天上午检查雌鼠,以见雌鼠阴栓记为已怀孕 1 d,并将孕鼠移出,进行单笼饲养,继续灌胃直至自然分娩;昆明小鼠的妊娠周期一般为 19~21 d,因此对于孕鼠,从见阴栓开始统计前 17 天的体质量的数据并统计出受孕率^[5]。根据记录的雌鼠体质量,计算合笼后的前 25 d 内非怀孕雌鼠的体质量增长率。以雌鼠出现阴栓直至分娩为一个统计周期,统计小鼠合笼后前 5 个周期内的雌鼠产仔数以及死胎数。

1.2.4 仔鼠外形畸形及平面翻正反射检查 仔鼠出生一周后,检查其外形是否畸形。参考文献[6],从仔鼠出生第 1 天开始进行平面翻正反射检查,每天 1 次至达标。具体如下:将仔鼠仰面置于一块水平放置且表面粗糙的木板上,每次试验 2 s,仔鼠在 2 s 内能翻转身体且四肢着地记为阳性反应,仔鼠在连续 3 d 测试中全部成功则定义为达标,记录达标所需天数。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行处理,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量增长率

2.1.1 非孕雌鼠体质量增长率 通过 Excel 对非孕鼠前 25 d 的体重数据进行计算并制图,添加趋势线,得出直线趋势方程式, $y = ax + b$ 中 a 为斜率,在本实验中相当于体质量增长率;由各组 a 值可以看出,与对照组比较,高、中实验组的雌鼠体质量增长率有所降低($P < 0.01$),低剂量组体重与正常对照比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1 和表 1。

2.1.2 孕鼠体质量增长率 以相同方法对孕鼠妊娠期前 17 d 的体质量数据进行计算并制图,得出直线趋势方程式和斜率 a 值(a 值代表体质量增长率),由各组 a 值可以看出,随着咖啡因的摄入剂量的增加,孕期雌鼠体质量增长率反而降低,低剂量组与对照组的体重增长率并无显著性差异,高、中剂量组明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2 和表 2。

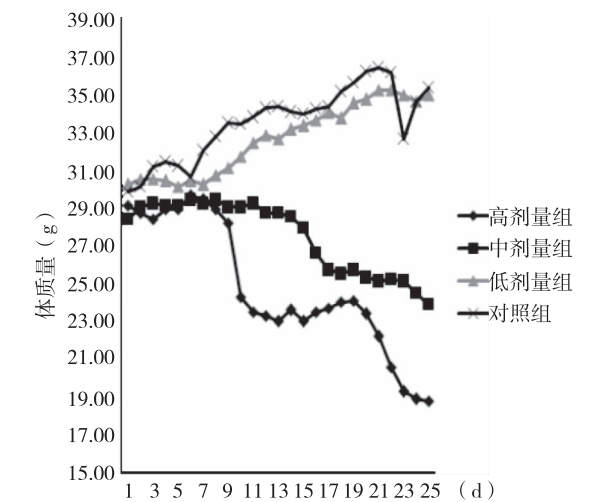


图 1 各组非孕雌鼠体质量
Fig.1 Weight changes of non-pregnant female rats

表 1 各组非孕雌鼠体质量增长率
Tab.1 Weight gain rate of non-pregnant rats

组别	直线趋势方程	体质量增长率
高剂量组	$y = -0.42803x + 30.714$	-0.43 ⁽¹⁾
中剂量组	$y = -0.21861x + 30.455$	-0.22 ⁽¹⁾
低剂量组	$y = 0.24659x + 29.161$	0.25
对照组	$y = 0.223x + 30.55$	0.22

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$

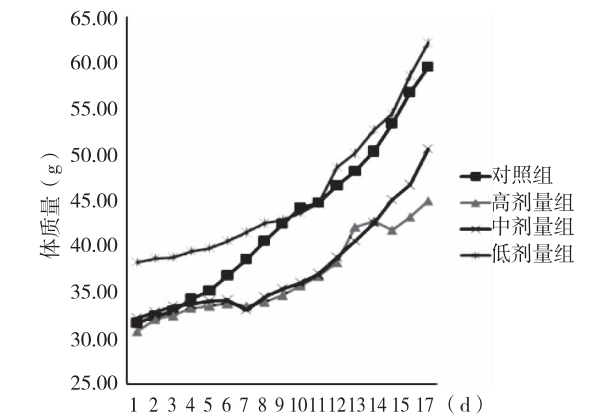


图 2 各组怀孕鼠体质量
Fig.2 Weight changes of pregnant rats

2.1.3 受孕率、产仔数及死胎率

与对照组比较,随着咖啡因的摄入剂量增加,雌鼠受孕率、产仔数降低,死胎数和死胎率增加;高、中、低剂量组雌鼠受孕率低于对照组,死胎数及死胎率高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高剂量组产仔数低于对照组($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 各组孕鼠体质量增长率
Tab.2 Weight gain rate of pregnant rats

组别	直线趋势方程	体质量增长率
高剂量组	$y = 0.85735x + 28.996$	0.86 ⁽¹⁾
中剂量组	$y = 0.99951x + 28.71$	0.10 ⁽¹⁾
低剂量组	$y = 1.3777x + 33.336$	1.38
对照组	$y = 1.697x + 27.59$	1.70

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$

表 3 各组孕鼠受孕率、产仔数、死胎数及死胎率
Tab.3 Pregnancy rate, new born number, stillbirth number and stillbirth rate of each group

组别	受孕率 (%)	产仔数 (n)	死胎数 (n)	死胎率 (%)
高剂量组	25 ⁽¹⁾	$9.6 \pm 1.67^{(1)}$	$9 \pm 1.22^{(1)}$	93.75 ⁽¹⁾
中剂量组	25 ⁽¹⁾	11.0 ± 1.0	$8.6 \pm 1.34^{(1)}$	78.18 ⁽¹⁾
低剂量组	50 ⁽²⁾	11.2 ± 1.3	$3.2 \pm 0.45^{(2)}$	28.57 ⁽²⁾
对照组	75	12.4 ± 1.52	0.8 ± 1.1	6.45

与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.05$

2.2 仔鼠畸形情况及平面翻正反射达标所需时间

仔鼠出生 1 周后,检查其外形均未见畸形。结果显示,高、中剂量组仔鼠平面翻正反射达标时间显著高于低剂量组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);提示咖啡因在雌鼠妊娠期间,会对其腹中的胎鼠神经产生一定的影响。见表 4。

表 4 各组仔鼠翻正实验达标所需时间
Tab. 4 The days needing for reaching standard
in righting reflex test

组别	达标所需时间(d)
高剂量组	10.000 ± 1.650 ⁽¹⁾
中剂量组	7.000 ± 1.070 ⁽¹⁾
低剂量组	4.000 ± 1.138
对照组	4.000 ± 0.995

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.01$

3 讨论

现在的日常生活中,咖啡因饮品已是无可替代的存在,与人类的生活息息相关,有临床研究报道指出咖啡因具有多种临床效果,可用于治疗早产儿呼吸暂停、支气管肺发育不良的疾病^[7-8]。咖啡因是国家管制的第二类精神性药物,摄入过量会引起中毒,持续的摄入咖啡因则可导致成瘾^[9]。女性孕前和孕期持续摄入咖啡因可导致妊娠时间降低、生育能力下降·早产甚至流产^[10-13],还会使新生儿的出生体重偏低,而在成长过程中增加肥胖发生的风险^[14]。有学者研究发现,咖啡因可降低小鼠的受孕率,并有剂量依赖性^[15],本研究在一定程度上验证了该结果,本研究实验组雌鼠受孕率明显下降,表明咖啡因的摄入对受孕会产生一定程度的影响,但高剂量组雌鼠也还具有一定的受孕率,说明受孕也受到多种自身和外界因素的影响。

从本实验雌鼠体质量测定结果来看,实验组孕鼠与非孕鼠与各自的空白对照组相比,经低剂量咖啡因灌胃的雌鼠体质量增长率并无显著性变化,但中、高低剂量体质量明显下降。咖啡因作为一种神经兴奋剂,多个文献报道其对于谷氨酸诱导的神经元损伤有可保护作用,并且对抑郁症和帕金森氏症也有一定的缓解作用^[16-18],但也有研究指出大量的咖啡因摄入可导致大鼠及家兔体质量下降^[19]。结合本课题组其他相关性研究,推测大剂量的咖啡因不仅不能够对神经元起到保护作用,反而会对神经元造成损伤,影响实验动物大脑的正常功能,阻碍其正常摄取食物,并且会通过机体内的神经系统影响各个脏器的正常功能,也会对子宫内胎鼠产生致畸作用。

先天性畸形主要受遗传和环境影响。环境的影响因素约占 10%,而化学品和药物的影响只占极小的一部分^[20]。本研究结果显示,与对照组比

较,随着咖啡因的摄入剂量增加,雌鼠受孕率、产仔数降低,死胎数和死胎率增加;高、中、低剂量组雌鼠受孕率低于对照组,死胎数及死胎率高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高剂量组产仔数低于对照组($P < 0.05$)。高、中剂量组仔鼠平面翻正反射达标时间显著高于低剂量组和对照组($P < 0.01$);提示咖啡因在雌鼠妊娠期间,会对其腹中的胎鼠神经产生一定的影响,这的与国内外报道咖啡因虽然并未使仔鼠发育畸形,但可引起仔鼠行为功能异常的结论相符^[21]。因此,咖啡因对胎儿的致畸性应引起人们的高度重视,尤其是对于妊娠期女性,不宜大量饮茶和咖啡,从而避免对胎儿的发育产生不良影响^[22]。

4 参考文献

[1] Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system; mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects [J]. Brain Research Reviews, 1992(2):139-170.

[2] Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, et al. Effects of caffeine on human health. [J]. Food Addit Contam, 2010(1):1-9.

[3] Cook DG, Peacock JL, Feyerabend C, et al. Relation of caffeine intake and blood caffeine concentrations during pregnancy to fetal growth: prospective population based study[J]. Bmj, 1996(7069):1358.

[4] Souza RA, Sichieri R. Caffeine intake and prematurity [J]. Revista De Nutricao, 2005(5):643-650.

[5] 张清林, 朱艳, 彭霞, 等. 昆明种小鼠生育力和胎仔生长发育的正常指标 [C]// 中国药理学会毒理专业委员会第十次学术会议论文摘要汇编. 2004.

[6] 范杰, 蒋建军, 尚兰琴, 等. 围生期双酚 A 暴露对大鼠子代行为发育的影响 [J]. 现代预防医学, 2012(11):2806-2808.

[7] 寇晨, 马建荣, KouChen, 等. 咖啡因在早产儿呼吸暂停治疗中的研究进展 [J]. 中国医药, 2016(6):936-938.

[8] Aranda JV, Beharry K, Valencia GB, et al. Caffeine impact on neonatal morbidities [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2010(4):20.

[9] Budney AJ, Emond JA. Caffeine addiction caffeine for youth time to act [J]. Addiction, 2014(11):1771.

[10] Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes; a review of exposure assessment considerations during pregnancy [J]. Annals of Epidemiology, 2005(6):460-466.

- [11] Okubo H, Miyake Y, Tanaka K, et al. Maternal total caffeine intake, mainly from Japanese and Chinese tea, during pregnancy was associated with risk of preterm birth; the Osaka Maternal and Child Health Study [J]. Nutrition Research, 2015(4):309-316.
- [12] Armstrong E, Harris LH, Kukla R, et al. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage[J]. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2008(5):e13.
- [13] Chen LW. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of pregnancy loss: a categorical and dose-response meta-analysis of prospective studies[J]. Public Health Nutrition, 2016(7):1233.
- [14] Li DK, Ferber JR, Odouli R. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of obesity in offspring: a prospective cohort study[J]. International Journal of Obesity, 2015(4):658.
- [15] Sata F, Yamada H, Suzuki K, et al. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss[J]. Molecular Human Reproduction, 2005(5):357-360.
- [16] 苏兴文, 皮荣标, 林穗珍, 等. 咖啡因对谷氨酸诱导神经元凋亡的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1999(6):509-512.
- [17] 郑祚康. 咖啡因通过促进肌肉中 PGC-1 α 的表达缓解抑郁症的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2016.
- [18] 王晨. DRP1-Ser637 去磷酸化促进多巴胺能神经元细胞线粒体自噬在咖啡因抗帕金森病中的作用研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [19] 万红平, 潘磊, Sue McPherson. 咖啡因对大鼠及家兔致畸敏感期发育毒性试验[C]// 中国毒理学会湖北科技论坛, 2015.
- [20] Pan X, Liu D, Wei M, et al. Influences of Caffeine Exposure on Embryonic Development in Mice[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2008(2):165-168.
- [21] Brent RL, Christian MS, Darkener RM. Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2011(2):152-187.
- [22] 郭彦君. 咖啡因暴露对胎儿生长发育的影响[J]. 中外医学研究, 2012(36):151-154.
(2017-02-14 收稿, 2017-04-18 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅

(上接第 507 页)

- [13] 朱卫, 李佳丽, 张利红, 等. 自体免疫细胞治疗联合化疗治疗大肠癌的临床研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2016(2):116-119.
- [14] Zhao X, Rajasekaran N, Chester C, et al. Reovirus activated NK cells show enhanced cetuximab mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against colorectal cancer cells[J]. Journal for immunotherapy of cancer, 2015(2):1-12.
- [15] Zhao X, Rajasekaran N, Chester C, et al. Natural killer cells activated by oncolytic reovirus enhance cetuximab mediated antibody dependent cellular cytotoxicity in an in vitro and in vivo model of colorectal cancer[J]. Blood, 2015(23):3439.
- [16] Zhao X, Rajasekaran N, Chester C, et al. Abstract B082: Reovirus treated NK cells exhibit enhanced cetuximab mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against colorectal cancer cell lines[J]. Cancer Immunology Research, 2016(1):B082-B082.
- [17] 庞翠, 王金燕, 胡志昊, 等. 负载肿瘤干细胞膜微粒的 DC-CIK/CTL 细胞协同西妥昔单抗对结直肠癌细胞的杀伤作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016(6):751-758.
- [18] Pievani A, Belussi C, Klein C, et al. Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies[J]. Blood, 2011(2):510-518.
- [19] Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, et al. Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2014(5):2115-2122.
- [20] Yang X, Zhang X, Mortenson ED, et al. Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses[J]. Mol Ther, 2013(1):91-100.
(2017-03-20 收稿, 2017-05-07 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周凌