

· 研究论文 ·

孕期酒精暴露对小鼠视皮质突触数量影响的体视学研究

席 艳, 张俊士, 臧建峰, 文曙光, 邓锦波*

(河南大学神经生物学研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 建立孕期酒精暴露 (PAE) 模型, 研究孕期酒精暴露对小鼠视皮质突触数量的影响。利用免疫荧光染色技术标记对照组与 PAE 模型组 (低剂量和高剂量) 子鼠出生后 0、7、14 及 30 d 视皮质突触前体的 synaptophysin 蛋白表达, 以此来代表突触, 观察其数密度变化, 并利用 Western blotting 检测对各实验组子代小鼠视皮质 synaptophysin 的表达量进行半定量分析。突触数密度值统计学分析显示: 对照组、低剂量和高剂量组间比较差异显著 ($P < 0.05$), 0、7、14 及 30 d 差异显著 ($P < 0.05$), 年龄与剂量之间存在交互作用 ($P < 0.05$) 且剂量的影响作用更大。Western blotting 检测结果与免疫荧光统计结果一致。这表明 PAE 对突触的影响具有长时程效应和剂量相关性, 突触丢失的长时程放大效应可能是患儿精神发育迟滞和记忆力下降的主要原因。

关键词: 孕期酒精暴露; 数密度; 突触; synaptophysin; 视皮质

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 06-0705-06

Stereological study on the synapse loss in visual cortex of mouse after prenatal alcohol exposure

XI Yan, ZHANG Jun-shi, ZANG Jian-feng, WEN Shu-guang, DENG Jin-bo*

(Institute of Neurobiology, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: In order to understand the alcohol's toxicity to the quantitative alternations of synapses in mouse visual cortex, the expression of synaptophysin after prenatal alcohol exposure was investigated. In present study, the experimental mice at P0, P7, P14 and P30 were grouped, as control, 2 g·kg⁻¹ alcohol treatment and 4 g·kg⁻¹ alcohol treatment. The pre-synaptic elements which were used to represent synapses were marked with synaptophysin (a synaptic vesicle associated protein) by immunocytochemistry technique. The synaptophysin positive boutons in layer VI of visual cortex were imaged under laser confocal microscope. With stereological methods, the number cal density of synapse in visual cortex was calculated in different groups at various ages. Moreover, Western blotting was carried out to detect the expression of synaptophysin in visual cortex. The results showed that prenatal alcohol exposure could cause synaptic loss with long-term effect and in a dose dependent manner. For instance, there were significant difference among the different treatment groups of P0, P14 and P30 as well ($P < 0.05$). Western blotting supported the results of immunofluorescent labeling. In conclusion, prenatal alcohol exposure can induce the synaptic loss dose dependently and with long-term effect. Our findings implicate that the synaptic loss with long term effect in CNS probably contributes to the lifelong mental retardation and memorial lowliness associated with childhood FAS.

Key words: prenatal alcohol exposure; number cal density; synapse; synaptophysin; visual cortex

收稿日期: 2009-11-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771140); 河南省教育厅自然科学基金项目 (2007180008); 河南省科技厅国际合作项目 (094300510044); 河南大学自然科学基金基础研究项目 (2008YBZR034).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-378-3880292, E-mail: jinbo_deng@henu.edu.cn

酒精、大麻和海洛因作为成瘾药物研究的重点, 受到科学工作者的广泛关注, 美国和其他西方国家投入大量资金推动酒精滥用相关的科学研究、临床治疗和社会保障。近些年来中国酒类消费比例的显著上升使我国将要面对酒精带来的越来越多的健康和社

会问题。孕期酒精暴露 (prenatal alcohol exposure, PAE) 会导致胎儿流产、死产、胎儿颜面部畸形、神经系统发育畸形以及出生后认知障碍等。临床上的胎儿酒精综合征 (fetal alcohol syndrome, FAS) 是 PAE 导致子代损害的一种典型表现, 其特征是患儿出生时伴有典型的颜面畸形和神经系统的发育异常, 成年后还会出现学习及社交能力下降等行为能力不足和人格缺陷的问题, 并由此带来一系列社会问题^[1]。Sullivan^[2]的研究表明, FAS 的病因只和母亲在怀孕期间滥用酒精有关, 而与父辈和上一辈是否饮酒关系不大。国外对 PAE 的研究多集中于酒精对子代神经系统的毒性作用, 如能量代谢、受体功能、蛋白表达等方面^[3], 而 PAE 对子代影响的长时程效应的报道尚不多见, 因此孕期的酒精暴露如何影响成年后子代的人格特征、行为及学习能力等问题难以得到合理解释。

众所周知, 突触与学习记忆的关系极为密切, 故研究酒精暴露后突触数量的变化有极其重要的意义, 作者采用 synaptophysin 荧光染色技术和数密度测量的方法进行研究^[4, 5]。Synaptophysin 是位于突触前体的囊泡膜蛋白, 功能与囊泡释放相关, 可以作为突触的特异性标记物, 在神经系统中稳定表达, 现已应用于老年痴呆、癫痫、精神分裂症等疾病突触数量的研究^[6-8]。本研究利用作者前期研究中建立的 PAE 模型, 研究 PAE 子代小鼠视皮质突触的数密度变化, 旨在探讨 PAE 对子代视皮质神经突触发育的影响及机制, 为深入理解孕期酒精暴露的危害, 解释孕期酒精暴露对子代的长时程影响及制定相关的卫生政策和保健指南提供重要的理论依据。

材料与方法

动物模型与分组 选 2~3 月龄健康 C57BL/6 小鼠 (由河南省实验动物中心提供, 合格证号 SYXK 豫 2005-0012), 雌鼠 60 只 (未生育), 雄鼠 10 只, 体重 20~30 g, 单笼饲养, 室温控制在 20~25 °C, 相对湿度 60%~70%, 定期更换垫料消毒。采光控制为 8 h 光照, 16 h 黑暗 (5:00 PM~9:00 AM)。自由进食水, 食物为河南省实验动物中心提供的小鼠标准饲料, 饮用水选用实验室自制单蒸水。

将 60 只雌鼠随机分为对照组 (10 只)、低剂量组 (20 只) 和高剂量组 (30 只), 雌雄小鼠 1:1 (5:00 PM) 合笼交配, 次日 9:00 检查阴道栓塞情况, 将发现阴栓之日定为妊娠第 1 天 (embryo day 0, E₀)。E₀

当日取出雄鼠, 妊娠雌鼠单笼如常饲养。随机选出不同剂量的实验组, 即对照组 (control, C)、低剂量组 (low dosage, L) 和高剂量组 (high dosage, H)。对照组仍自由饮食, 其余各组雌鼠从孕五日 (E₅) 到子鼠出生, 每日 9:00 禁食、水, 4 h 后 25%酒精灌胃 (L 组酒精剂量 2 g·kg⁻¹·d⁻¹、H 组酒精剂量 4 g·kg⁻¹·d⁻¹), 灌胃后恢复正常饲养。子鼠出生后第 1 个 24 h 内定为是生后第 0 天 (postnatal day 0, P0), 收集各组别生后 0 (P0)、7 (P7)、14 (P14) 及 30 d (P30) 子鼠, 每组不少于 5 只进行免疫荧光染色; 每组不少于 5 只小鼠进行 Western blotting 检测。

免疫荧光检测 Synaptophysin 聚集于突触前体, 可利用免疫荧光染色法显示, 并以荧光颗粒代表突触^[9]。同时, 显示皮质 I-VI 的片层化结构便于靶细胞定位, 由于 Foxp2 可以特异性地在皮质 VI 层神经细胞中表达^[10], 结合 DAPI 衬染, 可实现皮质分层显色。免疫荧光染色具体步骤如下: 4% 苯巴比妥钠 (30 mg·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉, 开胸暴露心脏。剪开右心耳, 自心尖部插管, 4% 多聚甲醛 (pH 7.4) 25 mL 缓慢灌注。断头取脑, 置 20 倍体积以上 4% 多聚甲醛 (pH 7.4) 固定 48 h (4 °C)。蒸馏水冲洗, 4% 琼脂糖包埋。取视皮制作为实验的靶组织, 震荡切片 (vibratome 1000 plus, NatureGene Corp, USA) 切片, 每块组织切 5 张切片, 厚度 50 μm。切片经 0.1 mol·L⁻¹ PB 漂洗。然后进行 synaptophysin 和 Foxp2 的荧光免疫双重标记: 加入一抗 (鼠抗人 synaptophysin, 1:500, Millipore, MAB368) 和 Foxp2 (兔抗人 Foxp2, 1:300, abcam, ab16046), 置 4 °C 冰箱中孵育过夜, PB 漂洗干净后加入二抗: 羊抗鼠 Alexa Fluor 568 (呈红色, 1:600, Molecular probes, A11004) 和驴抗兔 Alexa Fluor 488 (呈绿色, 1:300, Invitrogen, A11008) 室温下避光孵育 3 h, 后用 PB 漂洗 3 次, 最后用 DAPI (呈蓝色, 1:10 000, Roche, 10236276) 进行衬染, 荧光封片介质封片, 在 Olympus 荧光显微镜 (BX61, 日本) 下使用罗丹明、FITC 和紫外激发光进行观察、拍片。挑选质量较好的切片在激光扫描共聚焦显微镜 (Olympus, FV-1000) 下进行观察。

Western blotting 检测 利用 Western blotting 方法对各组视皮质组织内的蛋白质进行半定量分析, 具体操作如下。颈椎脱臼处死小鼠, 开颅取脑, 迅速剥离视皮质。按照试剂盒说明书提取膜蛋白 (膜蛋白提取试剂盒, Pierce, 89826) 至离心管中, 加入 9 倍体积预冷的丙酮 (分析纯, 开封开化集团有限公司试剂厂), 静置过夜; 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min (4 °C),

弃上清液; 室温干燥器中干燥; 加入 $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液重悬沉淀。采用考马斯亮蓝法进行蛋白质定量 (Coomassie Protein Assay Kit, 上海美季生物技术有限公司, M20303); 各组样品取蛋白 $15 \mu\text{L}$ 加入 $5\times\text{SDS}$ 上样缓冲液 $5 \mu\text{L}$, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 5 min ; 上样进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移蛋白至 NC 膜; 5% 脱脂奶粉封闭, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日加入一抗 (羊抗兔 synaptophysin, $1:500$, abcam, ab9272) 室温孵育 3 h ; 漂洗后入 HRP 标记的二抗 (驴抗兔 IgG, $1:2000$) 室温孵育 1 h , TBST 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 min ; ECL 发光液孵育 2 min , 胶片曝光显影, 结果用 Quality One 分析, 并以 β -actin (江苏碧云天生物技术有限公司, AA128) 做内对照, 以阳性条带与内对照条带光密度比值作为阳性条带的相对表达值。进行 5 次重复试验。

突触计数与统计学处理 免疫荧光标记后, 视皮质锥体细胞表面可以见到大量的 synaptophysin 红色荧光颗粒, 一般认为, 每一荧光颗粒可代表一个突触前体, 也即一个突触^[11]。同时, 依据 Foxp2 与 DAPI 荧光显色将体视学测量定位于皮质 VI 层, 原因是皮质各层中第 VI 层发育最早便于从 P0 开始进行比较 (图 1)。体视学方法可以通过二维结构信息推断实际的三维结构, 能够测量单位参照体积的突触数量, 是一种比较科学的计量学方法。本研究采用突触数密度 (单位: $\text{个}/\mu\text{m}^3$) 作为测量与统计参数。其具体测量步骤如下: 从实验图片中截取 $13.81 \mu\text{m}\times 13.81 \mu\text{m}$ 大小图片导入 Word 文档中, 绘制边长 $4.14 \mu\text{m}\times 4.14 \mu\text{m}$ 、 6×6 的正方格测试系统 (以每个测试小格左上角顶点为测试点), 正方格测试系统的尺寸依据图片放大倍数、荧光颗粒大小与实验要求误差共同选定^[12]。测量参照系内荧光颗粒的截面数、参照系测试点击中的荧光颗粒数, 将来源于同一切片的多个测量数据代入数密度计算公式 $N_v = \frac{[\sum N_x]^{3/2}}{\{1.382[3^{1/2}d^2/2]\}^{3/2} [\sum P_c][\sum P_x.n]}$ (N_v : 突触数密度, P_c : 参照系的测试点数, N_x : 参照系内被测粒子的截面数, $P_x.n$: 参照系测试点击中 synaptophysin 颗粒的截面数, d : 参照系测试线长度) 得出数密度值。12 组小鼠每组 5 只, 每只小鼠测量 5 张切片, 共得到 12×25 个数密度数据, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Spss 17.0 统计分析软件, 进行 Levene 检验和主体间效应检验, 多组比较使用 Fisher LSD 检验和 Student-Newman-Keuls (SNK) 检验, 以了解剂量、年龄两个因素对子鼠视皮质突触发育的影响。

结果

1 孕期酒精暴露对子鼠的影响

酒精处理组子代小鼠总体表现为早产多、发育缓慢、体重低、个头小、抗病能力差、死亡率高及各种畸形^[13]; 对照组则没有发现畸形和发育异常。对子鼠出生后 $0\sim 7 \text{ d}$ 死亡率进行分析发现, 高剂量组子鼠死亡率达 47.24% , 相应的低剂量组死亡率为 12.01% , 对照组子鼠的死亡率为 1.73% 。结果表明, 孕期酒精暴露对子代存活率及发育有明显的影响。

2 Synaptophysin 在视皮质的表达变化

激光共聚焦扫描显微镜显示, synaptophysin 在 P0 以后各组视皮质各层均有表达, synaptophysin 荧光颗粒代表的突触数量随子鼠孕期酒精暴露剂量升高而下降, 同时随子鼠年龄的增长而升高。横向比较 (剂量依赖性比较), 自对照组、低剂量组、高剂量组荧光颗粒密度呈下降趋势; 纵向比较 (长时程效应比较), 随年龄增加荧光颗粒密度呈上升趋势 (图 2)。子鼠视皮质突触数密度 ($\text{个}/\mu\text{m}^3$) 采用正方格计数法进行体视学测量 (图 1), 各组数据如表 1 所示。利用 SNK 检验对数据进行统计分析发现, 对照组、低剂量组、高剂量组间差异显著 ($P < 0.05$), P0、P7、P14、P30 年龄组间差异显著 ($P < 0.05$)。由于突触数密度受到年龄、剂量两个因素的影响, 对照组内 P0、P7、P14 和 P30 间存在显著差异 ($P < 0.05$), 但是在同一水平的酒精处理组内 P0、P7、P14 和 P30 的个别组无显著性差异 ($P > 0.05$)。为消除年龄因素对研究的影响, 还应进行主体间效应检验。检验结果发现, 年龄与剂量两个因素之间存在交互作用, 而且剂量 ($MS = 9.75$, $F = 140.44$, $P < 0.05$) 的影响比年龄 ($MS = 6.55$, $F = 94.26$, $P < 0.05$) 的影响作用稍大。Fisher LSD 检验在有显著差异的两组之间进行均数差值比较 CP0 与 LP0 ($I-J = 0.15$)、CP7 与 LP7 ($I-J = 0.18$)、CP14 与 LP14 ($I-J = 0.35$)、CP30 与 LP30 ($I-J = 0.56$)、CP0 与 HP0 ($I-J = 0.36$)、CP7 与 HP7 ($I-J = 0.52$)、CP14 与 HP14 ($I-J = 0.69$)、CP30 与 HP30 ($I-J = 0.93$), 发现年龄增高使对照组与酒精处理组的差异增大, 并且对照组与高剂量组的差异大于对照组与低剂量组的差异。所以, 尽管在同一水平的酒精处理组内 P0、P7、P14 和 P30 的个别组, 受年龄因素影响无显著性差异, 但是通过 Fisher LSD 检验在不同组别不同剂量之间进行比较, 不影响得出长时程放大效应的结论。

3 Western blotting 检测半定量分析 synaptophysin 蛋白表达量

利用 Western blotting 检测对 PAE 模型组和对照组

子鼠 P30、P14、P0 进行 synaptophysin 半定量检测, 以阳性条带与 β -actin 条带光密度比值作为 synaptophysin 的相对表达值 (图 3 和表 2)。结果显示: ① synaptophysin

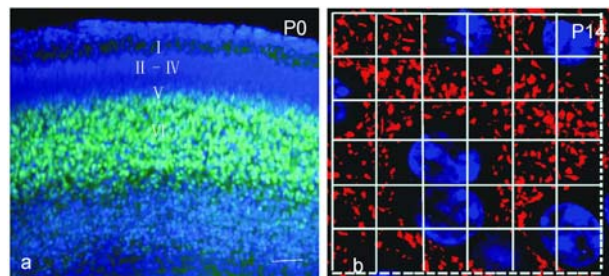


Figure 1 Lamination of visual cortex and the measurement area with stereological consulting system. (a) The lamination of visual cortex at P0 with Foxp2 immunocytochemistry (green) and DAPI counterstaining (blue). The layer I-VI was marked in the photo. (b) The high magnification of pyramidal cells with synaptophysin-positive puncta (red) at P14. The nuclei are visualized with DAPI staining. The synaptophysin puncta are located at the neuronal surface and dendrites, however, the cytoplasm of pyramidal cell lies between puncta and nucleus. The test system was overlapped on the photo, in order to show the stereological measurement. Bar = 60 μm for (a), 5 μm for (b)

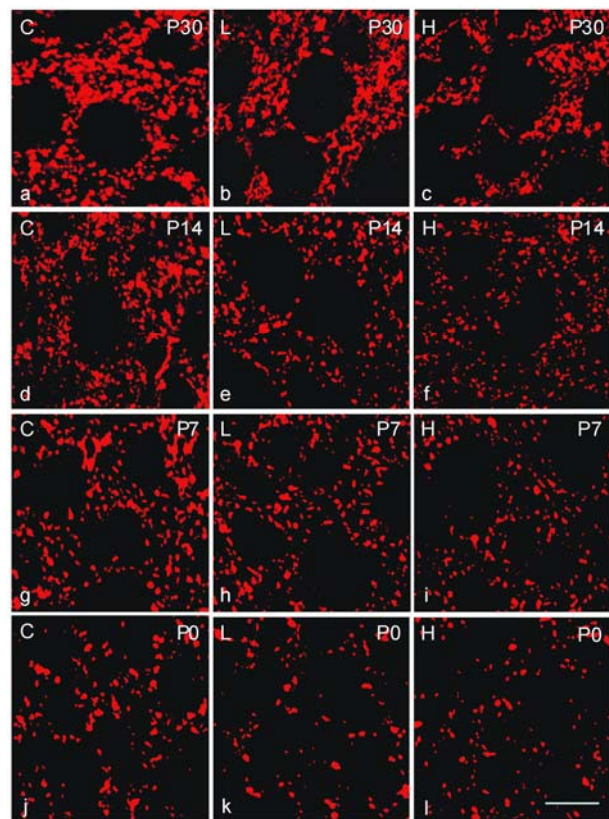


Figure 2 The expressions of synaptophysin (red) among different treatment groups at various ages (P0, P7, P14 and P30, a-l). The control group (C), low dose treatment (L, 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ alcohol treatment) and high dose treatment (H, 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ alcohol treatment) are marked in the photo. Bar = 10 μm in (a-l)

Table 1 The number cal density in different groups and SNK tests ($n = 25, \bar{x} \pm s$)

Treatment	Nv/punctum- μm^{-3}			
	P0	P7	P14	P30
Control	1.37 \pm 0.27	1.58 \pm 0.29 [▽]	1.84 \pm 0.23 [▽]	2.38 \pm 0.27 [▽]
Alcohol 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.21 \pm 0.22*	1.40 \pm 0.26 ^{*▽}	1.48 \pm 0.28*	1.82 \pm 0.28 ^{*▽}
Alcohol 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.00 \pm 0.26 [#]	1.06 \pm 0.27 [#]	1.15 \pm 0.26 [#]	1.46 \pm 0.27 ^{*#▽}

P: Postnatal day; Nv: Number cal density of synapse in unit volume. * $P < 0.05$, if alcohol treatment group versus control at same age; # $P < 0.05$, if high dose group versus low dose at same age; [▽] $P < 0.05$, if older age group versus young age group adjacent to it in the same alcohol treatment group; $n = 25$ means 25 sections for each group

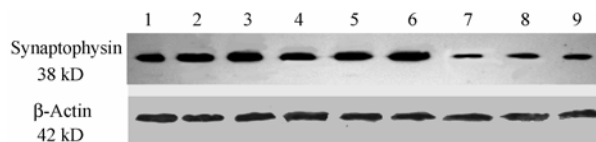


Figure 3 The expression of synaptophysin in visual cortex detected with Western blotting. 1, 4 and 7 were 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ alcohol treatment group at P30, P14 and P0, respectively; 2, 5 and 8 were 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ alcohol treatment group at P30, P14 and P0, respectively; 3, 6 and 9 were control group at P30, P14 and P0, respectively

Table 2 Semi-quantitative analysis of synaptophysin expression with Western blotting and SNK tests ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Treatment	Synaptophysin/ β -actin densitometric ratio		
	P0	P14	P30
Control	1.28 \pm 0.08	1.92 \pm 0.09	2.87 \pm 0.10
Alcohol 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.98 \pm 0.09*	1.38 \pm 0.09*	2.05 \pm 0.10*
Alcohol 4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.73 \pm 0.08*	0.94 \pm 0.10*	1.64 \pm 0.09*

* $P < 0.05$, if high dose versus low dose or control, and if low dose versus control; $n = 5$ means 5 animals for each group

在胶片上显示为分子质量为 38 kD 的活化片段, 这与文献^[14]报道是一致的; ② 酒精处理组低于对照组 ($P < 0.05$), 高剂量组低于低剂量组 ($P < 0.05$), 即孕期酒精暴露使子鼠视皮质 synaptophysin 蛋白表达量下降且具有剂量依赖性; ③ synaptophysin 蛋白表达量随子鼠年龄增长而增高, 各年龄组的组间差异显著 ($P < 0.05$)。

讨论

研究孕期酒精暴露对胎儿的危害, 常选用动物模型^[15, 16]。作者的工作着重于利用 PAE 模型研究年龄和酒精剂量的叠加对子鼠突触数量的影响, 从而达到研究孕期酒精暴露对子代神经发育长时程影响的目的。Lancaster 等^[17]也曾对孕期酒精暴露的子代进行研究, 然其以突触的平均面积为统计对象, 这种二维空间上的统计方法可能受到突触形态变化的影响, 因而不能反映三维空间上突触实际数量的变化。

与之相比,本研究采用体视学的方法进行组织定量,利用正方测试系统和 Weibel 提出的数密度计算方法得出视皮质单位体积内的突触数量变化^[18],这种方法突破了二维空间的局限,其结果更为准确,有利于解释形态结构和功能的关系。Jiang 等^[19]曾经报道孕期酒精暴露造成视皮质神经元凋亡的现象,然而突触是神经元发挥功能的重要单位,一个神经元通常有很多突触,这些突触与学习和记忆密切相关,因此利用 synaptophysin 研究突触的改变更利于解释 PAE 子代的神经行为改变。

本实验利用免疫荧光和体视学方法分析了 PAE 模型子代视皮质突触数密度的变化。对照组、低剂量组、高剂量组间差异显著 ($P < 0.05$) 且突触数密度依次降低,说明 PAE 可以造成子代突触数量的丢失,并且存在酒精剂量越高突触丢失越严重的剂量依赖关系。这种剂量依赖关系提示,孕妇在怀孕期间应绝对避免饮酒。Western blotting 半定量分析结果与免疫荧光结果一致,支持了上述结论,说明 PAE 扰乱了子鼠突触的发育,这也是造成突触丢失的主要原因。P0、P7、P14、P30 年龄组间比较差异显著 ($P < 0.05$),且突触数密度依次升高,说明年龄增长是突触数量变化的另一原因。突触在年龄上的变化可影响对孕期酒精暴露长时程效应的分析,主体间效应检验可以排除这一干扰,其结果显示年龄和剂量两个因素共同对子代突触数量产生影响(交互作用),剂量 ($MS = 9.75$, $F = 140.44$, $P < 0.05$) 的影响作用比年龄 ($MS = 6.55$, $F = 94.26$, $P < 0.05$) 稍大。这解释了 Fisher LSD 结果中对照组内 P0、P7、P14、P30 间差异显著 ($P < 0.05$),而 $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 与 $4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 酒精处理组内 P0、P7、P14、P30 间无显著性差异(表 1)的现象,正是年龄增长在一定程度上抵消了酒精暴露造成突触丢失的作用使酒精处理组内各年龄组间无显著性差异。Fisher LSD 检验还有一个重要发现,即年龄增高会使对照组与酒精处理组的差异增大,并且对照组与高剂量组的差异大于对照组与低剂量组的差异,这说明 PAE 造成突触丢失的作用会随着子鼠年龄的增大而被放大,这种放大效应可以解释 PAE 子代成年后(相当于小鼠 P30) 社会行为能力低、易于罹患精神疾病等问题。同时子代突触丢失的长时程放大效应还揭示:即便子代出生时不能被诊断为 FAS 综合征,成年后酒精对神经系统的损害依然可以表现出来。从这点意义上讲,母体孕期饮酒对子代发育的损害是持久的、不可逆的。而且,突触丢失可能是 PAE 对儿童学习记忆造成影响的病理学基础^[20]。

基于对孕期酒精暴露造成突触丢失和长时程放大效应的认识,寻找合适的治疗药物以提高 PAE 子代的生存质量已经成为共识。目前,国外已经开始了运用中枢神经系统兴奋剂对 PAE 子代进行干预治疗的探索。但是,前期的研究工作表明由于 PAE 子代脑的结构与神经递质传递都有异常,故其对许多药物的反应也与常人不同^[21]。因此在下一步的研究中应该对突触丢失的机制做进一步探讨。然而 PAE 影响神经系统发育的机制目前还不十分清楚,本研究所做的前期工作发现 PAE 对神经系统的影响与 NMDA-NR1 的功能有关^[22];也有报道 PAE 伴随 PKC (protein kinase C) 激活并降低 GAP-43 蛋白的磷酸化^[23],但是这些学说单独都不足以解释本实验中观察到的 PAE 对突触丢失的长时程放大效应。作者推测,酒精影响突触发育受综合因素的影响,如神经受体(如 AMPA、NMDA-NR1 等)^[24]和细胞因子(如细胞间黏附分子)^[25-27]等。PAE 的这些影响发生在突触发育的关键时期(in utero),由此引起的突触丢失会随年龄增长逐步显现出来,呈现出长时程放大效应。

综上所述,孕期酒精暴露对子代的神经系统的影响具有剂量相关性及长时程放大效应。一方面应该充分认识到孕期饮酒对胎儿发育及家庭社会带来的不利影响,要求孕妇避免饮酒;另一方面也应该看到孕期酒精暴露对子代神经系统影响的机制、FAS 的产前诊断、孕期酒精暴露出生后胎儿治疗有关的药物开发等诸多领域都大有可为。

References

- [1] Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Foetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behavior [J]. Alcohol Alcohol, 2009, 44: 108-114.
- [2] Spohr HL, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders and their persisting sequelae in adult life [J]. Dtsch Arztebl Int, 2008, 105: 693-698.
- [3] Cummings AM, Kavlock RJ. Gene-environment interactions: a review of effects on reproduction and development [J]. Crit Rev Toxicol, 2004, 34: 461-485.
- [4] Duffau H. Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications [J]. J Clin Neurosci, 2006, 13: 885-897.
- [5] Xi Y, Wan JH, Deng JB. Synaptic plasticity: biophysical basis and stereological measurements [J]. Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术), 2009, 4: 370-373.
- [6] Leuba G, Savioz A, Vernay A. Differential changes in synaptic

- proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein [J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 15: 139–151.
- [7] Lorigados L, Orozco S, Morales L, et al. Neuronal death in the neocortex of drug resistant temporal lobe epilepsy patients [J]. *Neurologia*, 2008, 23: 555–565.
- [8] Glantz LA, Lewis DA. Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia: regional and diagnostic specificity [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 1997, 54: 660–669.
- [9] Masliah E, Ellisman M, Carragher B, et al. Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1992, 51: 404–414.
- [10] Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, et al. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA developing and mature brain [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 460: 266–279.
- [11] Masliah E, Terry RD, Alford M, et al. Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections [J]. *J Histochem Cytochem*, 1990, 38: 837–844.
- [12] Yu YN, Liu GQ. *Stereology: Quantitative Analysis of the Theory and Application* (体视学: 组织定量分析的原理和应用) [M]. Beijing: Metallurgical Industry Press, 1989: 58–75.
- [13] Hofer R, Burd L. Review of published studies of kidney, liver, and gastrointestinal birth defects in fetal alcohol spectrum disorders [J]. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*, 2009, 85: 179–183.
- [14] Honer WG, Kaufmann CA, Davies P. Characterization of a synaptic antigen of interest in neuropsychiatric illness [J]. *Biol Psychiatry*, 1992, 31: 147–158.
- [15] Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005, 230: 389–393.
- [16] Bonthius DJ, West JR. Blood alcohol concentration and microencephaly: a dose-response study in the neonatal rat [J]. *Teratology*, 1998, 37: 223–231.
- [17] Lancaster F, Delaney C, Samorajski T. Synaptic density of caudate-putamen and visual cortex following exposure to ethanol in utero [J]. *Int J Dev Neurosci*, 1989, 7: 581–589.
- [18] Shen H, Shen ZY. *Practical Biology Stereology Techniques* (实用生物体视学技术) [M]. Guangzhou: Zhongshan University Press, 1991: 89–100.
- [19] Jiang QY, Hu YQ, Wu P, et al. Prenatal alcohol exposure and the neuroapoptosis with long-term effect in visual cortex of mice [J]. *Alcohol Alcohol*, 2007, 42: 285–290.
- [20] Singh AK, Gupta S, Jiang Y, et al. *In vitro* neurogenesis from neural progenitor cells isolated from the hippocampus region of the brain of adult rats exposed to ethanol during early development through their alcohol-drinking mothers [J]. *Alcohol Alcohol*, 2009, 44: 185–198.
- [21] Olney JW. New insights and new issues in developmental neurotoxicology [J]. *Neurotoxicology*, 2002, 23: 659–668.
- [22] Deng JB, Elberger AJ. Corpus callosum and visual cortex of mice with deletion of the NMDA-NR1 receptor. II. Attenuation of prenatal alcohol exposure effects [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003, 144: 135–150.
- [23] Tanner DC, Githinji AW, Young EA, et al. Fetal alcohol exposure alters GAP-43 phosphorylation and protein kinase C responses to contextual fear conditioning in the hippocampus of adult rat offspring [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004, 28: 113–122.
- [24] Valenzuela CF, Partridge LD, Mameli M, et al. Modulation of glutamatergic transmission by sulfated steroids: role in fetal alcohol spectrum disorder [J]. *Brain Res Rev*, 2008, 57: 506–519.
- [25] Caldwell KK, Sheema S, Paz RD, et al. Fetal alcohol spectrum disorder-associated depression: evidence for reductions in the levels of brain-derived neurotrophic factor in a mouse model [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 90: 614–624.
- [26] Arevalo E, Shanmugasundararaj S, Wilkemeyer MF, et al. An alcohol binding site on the neural cell adhesion molecule L1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 371–375.
- [27] Mellott TJ, Follettie MT, Diesl V, et al. Prenatal choline availability modulates hippocampal and cerebral cortical gene expression [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 1311–1323.