

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.15.005

补充维生素 D 对小鼠发育行为的影响研究 *

吴楠^{1,2} 夏阳¹ 李曼曼¹ 王朕¹ 李秋实¹ 仰曙芬^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086; 2 哈尔滨市儿童医院 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要 目的:本研究通过对子代小鼠维生素 D 的干预,探讨维生素 D 对子代小鼠行为的重要影响,为孕期补充维生素 D 提供理论依据。**方法:**建立孕鼠维生素 D 缺乏的实验模型。将子代小鼠分为三组:肌注维生素 D 的低剂量饮食组(a 组,补充组)、肌注生理盐水的低剂量饮食组(b 组,缺乏组)和正常饮食组(c 组)。在第 24 天和第 60 天时,采用旷场实验、Morris 水迷宫实验、社交试验对子代小鼠的行为进行监测。**结果:**孕期维生素 D 缺乏对子代小鼠的维生素 D 水平有显著的影响,子代小鼠出生 10 天时血清维生素 D 的浓度分别为:低剂量饮食组 $12.98 \pm 0.65 \mu\text{g/L}$, 正常饮食组 $35.38 \pm 1.13 \mu\text{g/L}$, 两组浓度值差异显著 ($P < 0.05$)。旷场实验中,第 24 天时,缺乏组子代小鼠的运动总路程为 $1044 \pm 89.21 \text{ cm}$, 显著少于补充组 ($1701.56 \pm 150.5 \text{ cm}$) 和正常组 ($1755 \pm 154.2 \text{ cm}$), 而其在中央区停留的时间为 $34.84 \pm 3.54 \text{ s}$, 显著高于补充组 ($21.36 \pm 3.05 \text{ s}$) 和正常组 ($21.77 \pm 3.64 \text{ s}$), 其在周边停留的时间为 $265.2 \pm 3.54 \text{ s}$, 显著少于补充组 ($278.6 \pm 3.05 \text{ s}$) 和正常组 ($278.2 \pm 3.64 \text{ s}$); 第 60 天时缺乏组子代小鼠在中央区停留的时间为 $28.79 \pm 3.68 \text{ s}$, 显著高于补充组 ($17.21 \pm 2.59 \text{ s}$) 和正常组 ($18.37 \pm 1.99 \text{ s}$), 其在周边停留的时间为 $271.2 \pm 3.68 \text{ s}$, 显著少于补充组 ($282.7 \pm 2.54 \text{ s}$) 和正常组 ($281.6 \pm 1.99 \text{ s}$)。缺乏组在第 60 天时行动总路程为 $1653 \pm 141 \text{ cm}$ 低于其他两组, 但差异不显著。Morris 水迷宫实验中, 三组子代小鼠第 24 天的穿越次数均显著高于第 60 天, 呈现先增加后降低的趋势, 而缺乏组的降低趋势更为明显。平台停留时间方面, 三组子代小鼠在第 60 天均多于第 24 天, 呈增加趋势。社交实验中, 第 24 天时三组小鼠探索空笼子的时间没有明显差异, 但缺乏组小鼠与代表新伙伴的陌生鼠 1 接触的时间低于与空笼子的接触时间, 而正常组和补充组小鼠与陌生鼠接触的时间明显多于空笼子。第 60 天时三组小鼠探索空笼子的时间也没有明显差异, 虽然缺乏组小鼠与陌生鼠的接触时间略高于与空笼子的接触时间, 但差异不显著, 而正常组和补充组小鼠与陌生鼠接触的时间仍明显多于空笼子。**结论:**向维生素 D 缺乏的子代小鼠补充维生素 D 能够对子代小鼠的兴奋性、空间认知能力、学习记忆能力和社交行为产生良性影响, 在发育早期进行维生素 D 补充具有重要的预防作用。

关键词: 维生素 D; 孕期维生素 D 缺乏; 神经行为

中图分类号: R-33; R723.2; R174 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)15-2824-06

Effects of Vitamin D Supplementation on Neurobehavior of Mice*

WU Nan^{1,2}, XIA Yang¹, LI Man-man¹, WANG Zhen¹, LI Qiu-shi¹, YANG Shu-fen^{1Δ}

(1 The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China;

2 Harbin Children's Hospital, Harbin, Heilongjiang, 150010, China)

ABSTRACT Objective: Through the intervention of vitamin D in offspring mice, this study explored the important influence of vitamin D on behavior of offspring mice, and provided theoretical basis for vitamin D supplement during pregnancy. **Methods:** To establish an experimental model of vitamin D deficiency in pregnant mice. The offspring mice were divided into three groups: the low-dose diet group (group A, supplemented group), the low-dose diet group (group B, deficient group) and the normal diet group (Group C). On the 24th and 60th day, open field experiment, Morris water maze experiment and social interaction experiment were used to monitor the behavior of the offspring mice. **Results:** Vitamin D deficiency during pregnancy had a significant effect on the level of vitamin D in offspring mice. The concentration of serum vitamin D in offspring mice was $12.98 \pm 0.65 \mu\text{g/L}$ in the low dose diet group and $35.38 \pm 1.13 \mu\text{g/L}$ in the normal diet group, respectively, with a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). In the open field test, on the 24th day, the total movement distance of the mice in the deficient group was $1044 \pm 89.21 \text{ cm}$, significantly less than that in the supplement group ($1701.56 \pm 150.5 \text{ cm}$) and the normal group ($1755 \pm 154.2 \text{ cm}$), while the duration of staying in the central area was $34.84 \pm 3.54 \text{ s}$, significantly higher than that in the supplement group ($21.36 \pm 3.05 \text{ s}$) and the normal group ($21.77 \pm 3.64 \text{ s}$), and the duration of staying around was $265.2 \pm 3.54 \text{ s}$, significantly less than that in the supplement group ($278.6 \pm 3.05 \text{ s}$) and the normal group ($278.2 \pm 3.64 \text{ s}$) on the 60th day, the duration of stay in the central area of mice in the deficient group was $28.79 \pm 3.68 \text{ s}$ significantly higher than that in the supplement group ($17.21 \pm 2.59 \text{ s}$) and the normal group ($18.37 \pm 1.99 \text{ s}$), and the duration of stay in the peripheral area was $271.2 \pm 3.68 \text{ s}$ significantly shorter than that in the supplement group ($282.7 \pm 2.54 \text{ s}$) and the normal group ($281.6 \pm 1.99 \text{ s}$). The total distance of $1653 \pm$

* 基金项目: 黑龙江省科技攻关重点项目 (GC12C306)

作者简介: 吴楠 (1981-), 女, 在职硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 儿童保健, E-mail: wu1981nan@163.com, 电话: 17703608620

Δ 通讯作者: 仰曙芬 (1964-), 女, 硕士生导师, 教授, 主要研究方向: 儿童保健, E-mail: yangshufen56@sina.com, 电话: 13503626075

(收稿日期: 2020-02-21 接受日期: 2020-03-18)

141 cm in the deficiency group was lower than that in the other two groups, but the difference was not significant. In Morris water maze test, the crossing times of the three groups of mice on the 24th day were significantly higher than those on the 60th day, showing the trend of increasing first and then decreasing, while the trend of decreasing in the deficient group was more obvious. As for platform residence time, the number of offspring mice in the three groups was more on the 60th day than on the 24th day, showing an increasing trend. In the social interaction test, there was no significant difference in the time of exploring the empty cage among the three groups on the 24th day, but the contact time between the deficient group and the strange mouse (stranger1) representing the new partner was shorter than that with the empty cage, while the contact time between the normal group and the supplement group was significantly longer than that of the empty cage. On the 60th day, there was no significant difference in the time of exploring the empty cage among the three groups. Although the contact time between the deficient group and the strange mice was slightly longer than that between the deficient group and the empty cage, the difference was not significant, while the contact time between the normal group and the supplement group was still significantly longer than that between the empty cage. **Conclusions:** The supplement of vitamin D to the offspring of mice with vitamin D deficiency can have a positive effect on the excitability, spatial cognitive ability, learning and memory ability and social behavior of the mice offspring, vitamin D supplementation in early development has an important preventive effect.

Key words: Vitamin D; Vitamin D deficiency during pregnancy; Neurobehavior

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R723.2; R174 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)15-2824-06

前言

人体内维生素 D 主要来源是日晒和食物摄入, 其不仅具有调节体内钙和磷酸盐的代谢的作用, 而且对神经发育、免疫调节、抗氧化、抗凋亡、神经分化和基因调控同样必不可少^[1,2]。维生素 D 主要通过其核激素受体调节中枢神经系统功能, 该受体在中枢神经系统几乎所有区域的神经元和神经胶质细胞中表达^[3], 它控制神经元的分化和成熟、调节神经递质的基因表达, 并具有神经保护特性和抗氧化作用。同时维生素 D 还参与钙的运输、氧化还原状态以及诱导突触结构蛋白、神经营养因子、神经递质的合成等^[4]。

目前维生素 D 缺乏症是世界范围内的公共健康问题^[6-8]。以往的研究显示维生素 D 缺乏一直伴随着烦躁, 焦虑, 抑郁, 精神病和智力发育缺陷^[9]。母体孕期的维生素 D 缺乏与先兆子痫的风险增加有关, 这可能间接影响子代的健康^[10]。同时它也与对后代健康产生直接的影响, 如低出生体重, 骨骼健康状况不佳, 受损的大脑发育, 自身免疫性疾病, 肥胖和胰岛素抵抗等有关^[11-17]。如果这种缺陷发生在发育的关键时期, 则可能导致这种变化持续到成年, 并增加了不同的精神和神经疾病的风险, 例如认知能力下降、注意力缺陷和多动症 (ADHD)、自闭症谱系障碍 (ASD)、精神分裂症、帕金森病和抑郁症等^[18-20]。

最近对母体维生素 D 缺乏与长期子代健康之间关系的关注已转移到维生素 D 作为 " 胎儿编程 " 中的调节剂的作用, 也被称为健康与疾病的发展起源^[21], 但目前国内外在其对子代神经系统的影响方面的研究仍然有限。本研究的目的是通过建立维生素 D 缺乏的子代小鼠模型, 继而对子代小鼠进行维生素 D 干预, 检测其对运动、认知及社交等行为的影响, 为孕期补充维生素 D 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 8 周龄 BALB/C 小鼠, 体质量雌鼠 (19 - 23 g), 雄鼠 (22 - 26 g), 购自哈尔滨医科大学附属第二医

院动物实验室中心[动物许可 CXK(黑)2013-001]。

1.1.2 主要试剂 低剂量饮食(维生素 D3 为 25 IU/kg)购买于北京科澳协力饲料有限公司。抗小鼠 β -actin 抗体购自上海碧云天生物技术公司。小鼠维生素 D3 ELISA 试剂盒购买于黑龙江久丰生物工程有限公司。液氮购于哈尔滨黎明气体有限公司。

1.2 实验方法

所有动物实验都经哈尔滨医科大学附属第二医院伦理委员会批准, 并严格按相关规定操作。

1.2.1 维生素 D 缺乏子鼠模型 选择清洁、健康的 BALB/C 小鼠 36 只, 随机分成 3 组, 每组 12 只(雌雄各半), 其中 a 组和 b 组均为低剂量组, 从自购买后第一天开始一直喂养低剂量饮食(维生素 D3 为 25 IU/kg), 直至产仔; c 组为正常饮食组, 一直喂养正常饮食(VD > 800 IU/kg)。于 10 周龄下午 19:00 以雌雄 2:1 比例合笼交配, 次日上午观察到小鼠阴道粘液栓, 连续观察 4 天, 观察到粘液栓为孕第 1 天, 产仔 10 天后子鼠另笼饲养。对所有雌鼠进行孕前血清维生素 D 检测, 判定模型建立是否成功。判定标准参考美国内分泌学会建议, 25 (OH) D 小于 20 $\mu\text{g/L}$ 为缺乏, 介于 21-29 $\mu\text{g/L}$ 为不足, 介于 30-60 $\mu\text{g/L}$ 为充足。对出生 10 天的子鼠进行血清维生素 D 含量的测量。将子代维生素 D 缺乏小鼠亦分为三组: a 组低剂量饮食同时肌肉注射补充维生素 D (即补充组), b 组低剂量饮食同时注射生理盐水 (即缺乏组), c 组为空白对照组喂养正常饮食 (即正常组)。分别在 24 天、60 天进行行为监测及化学物质检测。每组随机选 10 只进行实验。

1.2.2 动物分组 见表 1。

1.2.3 子鼠行为监测 行为监测试验场地由黑龙江省中医药大学附属第二医院提供。

运动能力 - 旷场实验 (Open Field Test), 小鼠旷场试验装置由两部分组成: 黑色测试箱 (长×宽×高为 50 cm×45 cm×45 cm 顶部开口的箱子) 和远红外线摄像头 (置于箱子正上方用于记录被测鼠的活动)。将测试小鼠迅速放入旷场箱的中央区, 使用自动跟踪系统记录测试小鼠 30 min 内的活动轨迹、总的活动路程、在周边的活动时间以及在中央区活动时间。

表 1 动物分组

Table 1 Animal grouping

Groups	Rat offspring administration	Rat offspring diet
Supplementary Group(Group a)	Intramuscular vitamin D3	Low-dose diet
Shortage Group(Group b)	No medication	Low-dose diet
Control Groups(Group c)	No medication	Normal diet

学习记忆能力 - Morris 水迷宫实验(Morris Water Test),使用的装置由 Morris 水迷宫箱体(直径为 120 cm、高 30 cm 的灰白的铁皮圆形蓄水池)及 Smart V3.0 视频跟踪平台软件(西班牙拜普 -Panlab 有限公司)两部分组成,通过自动分析系统软件将圆形水池分为四个相等的象限。在第三象限中心距离池壁 35 cm 处放一个直径为 8cm 的圆形平台,水池正上方配有红外追踪摄像头。第一阶段用于检测小鼠的学习能力,实验连续 4 天,每天上午 2 次,下午 2 次,每天都在相同的时间进行训练。第二阶段,实验第 5 天移除平台,将被测鼠从第一象限入水点放入水池,用自动分析系统记录其 1 min 内在被测小鼠到达隐藏平台所花费的时间(潜伏期)、穿越平台的次数以及在平台停留的时间。

社交行为(Social Interaction Test)实验,采用包含 3 个大小相同矩形箱子长×宽×高为 60 cm×40 cm×20 cm 的社交行为观察室。在幼鼠出生后 24 天和 60 天,分别从正常组和低剂量组选择 5 只小鼠进行检测。测试选用社交行为专用陌生小鼠,第一阶段,将测试小鼠放进中间的箱子里适应 5 分钟;第二阶段,将陌生鼠放入左侧的金属笼子里,另外一侧箱子的金属笼子空着,观察 10 分钟内小鼠同陌生小鼠或空鼠笼的互动时间和房内逗留的时间。

每次测试后均用 75%的医用酒精擦拭箱的内壁和底部,并晾晒 5 min,达到无味残留。所有的测试都在上午 8 点到下午 6 点之间完成。

1.3 数据分析

使用 GraphPadPrism7.0 软件进行统计制图,采用 Super-Maze 动物行为实验分析软件处理数据。所有数据均用均数±标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验。 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠维生素 D 浓度检测结果

2.1.1 孕鼠血清维生素 D 浓度的检测结果 低剂量饮食组母鼠($n=22$)孕期血清维生素 D 的浓度为 $14.81\pm0.66 \mu\text{g/L}$,浓度范围为 20.86 至 $9.54 \mu\text{g/L}$ 。正常饮食组母鼠($n=11$)孕期血清维生素 D 的浓度为 $30.72\pm1.86 \mu\text{g/L}$,浓度范围为 37.35 至 $18.21 \mu\text{g/L}$ 。两组浓度值差异显著($P<0.05$)。

2.1.2 子代小鼠血清维生素 D 浓度的检测结果 子代小鼠出生 10 天时测量其血清维生素 D 的浓度。低剂量饮食组子代小鼠($n=20$)血清维生素 D 的浓度为 $12.98\pm0.65 \mu\text{g/L}$,浓度范围为 18.61 至 $9.03 \mu\text{g/L}$ 。正常饮食组子代小鼠($n=10$)血清维生素 D 的浓度为 $35.38\pm1.13 \mu\text{g/L}$,浓度范围为 39.92 至 $28.26 \mu\text{g/L}$ 。两组浓度值差异显著($P<0.05$)。

2.2 行为发育检测结果

2.2.1 运动能力检测 采用旷场实验(Open Field Test)评价子代小鼠运动、探索功能受孕期维生素 D 缺乏的影响程度。子代小鼠出生第 24 天(图 1A),补充组(a 组, $n=10$)所行的总路程为 $1701.56\pm150.5 \text{ cm}$,范围 1038 至 2499 cm;缺乏组(b 组, $n=10$)所行的总路程为 $1044\pm89.21 \text{ cm}$,范围 545.3 至 1557 cm;正常组(c 组, $n=10$)所行的总路程为 $1755\pm154.2 \text{ cm}$,范围 1049 至 2558 cm。a 组和 b 组之间差异显著($P=0.005$),a 组和 c 组之间无显著差异($P=0.957$),b 组和 c 组之间差异显著($P=0.002$)。

子代小鼠出生第 24 天(图 1B),补充组(a 组, $n=10$)中央区停留时间为 $21.36\pm3.05 \text{ s}$,范围 4.82 至 37.96 s;缺乏组(b 组, $n=10$)中央区停留时间为 $34.84\pm3.54 \text{ s}$,范围 16.03 至 50.3 s;正常组(c 组, $n=10$)中央区停留时间为 $21.77\pm3.64 \text{ s}$,范围 13.84 至 49.28 s。a 组和 b 组之间差异显著($P=0.025$),a 组和 c 组之间无显著差异 $P=0.996$,b 组和 c 组之间差异显著($P=0.03$)。

子代小鼠出生第 24 天(图 1C),补充组(a 组, $n=10$)周边停留时间为 $278.6\pm3.05 \text{ s}$,范围 262.04 至 295.18 s;缺乏组(b 组, $n=10$)周边停留时间为 $265.2\pm3.54 \text{ s}$,范围 249.70 至 283.97 s;正常组(c 组, $n=10$)周边停留时间为 $278.2\pm3.64 \text{ s}$,范围 250.72 至 286.16 s。a 组和 b 组之间差异显著 $P=0.025$,a 组和 c 组之间

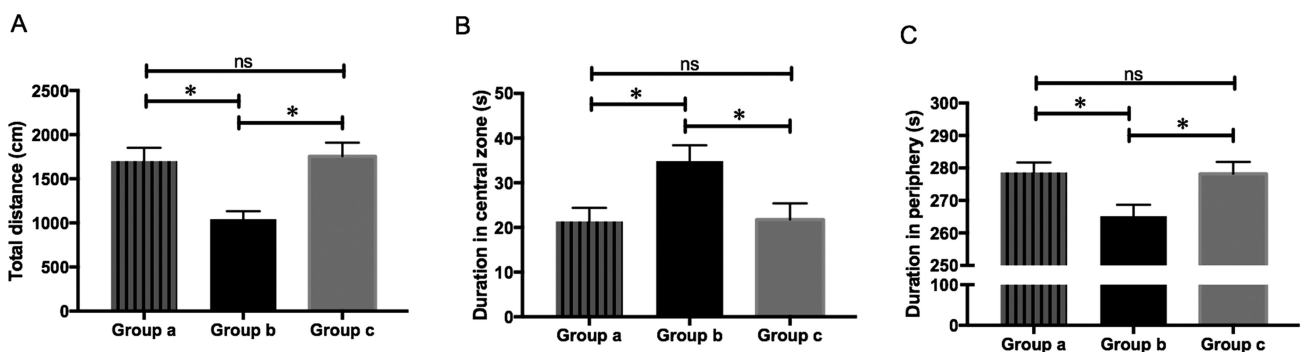


图 1 子代小鼠第 24 天旷场试验结果比较

Fig. 1 Result of Open Field Test of mice pups at PND24

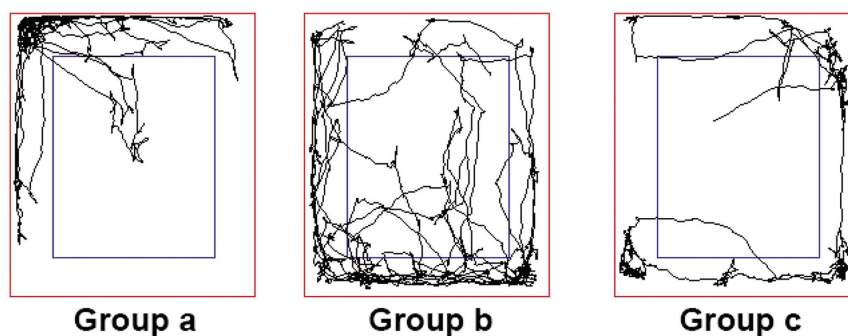


图 2 24 天小鼠旷场运动路线图

Fig. 2 Mouse Field Movement Roadmap at PND24

无显著差异 $P=0.996$, b 组和 c 组之间差异不显著 $P=0.030$ 。

子代小鼠出生第 60 天(图 3A), 补充组(a 组, $n=10$)所行的总路程为 1919 ± 150.7 cm, 范围 1052.57 至 2637.71 cm; 缺乏组(b 组, $n=10$) 所行的总路程为 1653 ± 141 cm, 范围 1105.32 至 2654.14 cm; 正常组(c 组, $n=10$) 所行的总路程为 1746 ± 158.7 cm, 范围 1003.54 至 2502.68 cm。a 组和 b 组之间差异不显著($P=0.434$), a 组和 c 组之间无显著差异($P=0.698$), b 组和 c 组之间差异不显著($P=0.900$)。

子代小鼠出生第 60 天(图 3B), 补充组(a 组, $n=10$)中央区停留时间为 17.21 ± 2.59 s, 范围 4.03 至 28.51 s; 缺乏组(b 组,

$n=10$)中央区停留时间为 28.79 ± 3.68 s, 范围 10.05 至 43.84 s; 正常组(c 组, $n=10$)中央区停留时间为 18.37 ± 1.99 s, 范围 9.31 至 27.67 s。a 组和 b 组之间差异显著($P=0.020$), a 组和 c 组之间无显著差异 $P=0.955$, b 组和 c 组之间差异显著($P=0.039$)。

子代小鼠出生第 60 天(图 3C), 补充组(a 组, $n=10$)周边停留时间为 282.7 ± 2.54 s, 范围 271.49 至 295.18s; 缺乏组(b 组, $n=10$)周边停留时间为 271.2 ± 3.68 s, 范围 256.16 至 289.95 s; 正常组(c 组, $n=10$)周边停留时间为 281.6 ± 1.99 s, 范围 272.33 至 290.69 s。a 组和 b 组之间差异显著 $P=0.020$, a 组和 c 组之间无显著差异 $P=0.960$, b 组和 c 组之间差异显著 $P=0.038$ 。

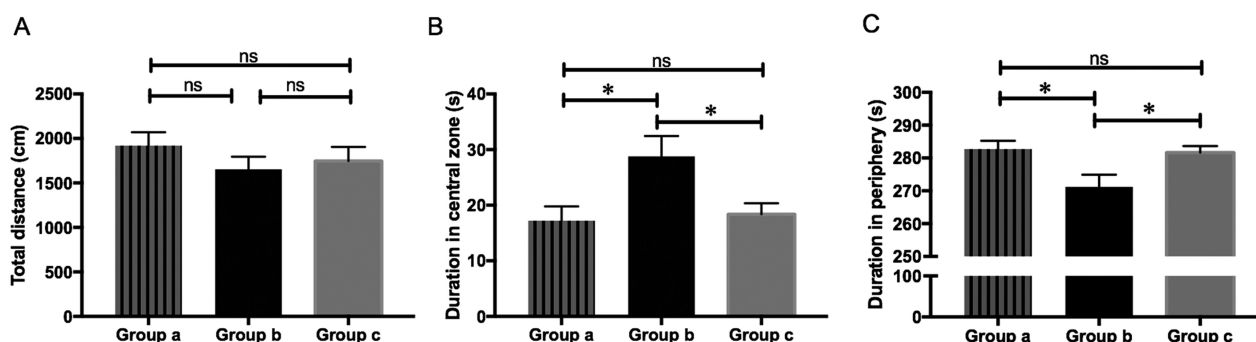


图 3 子代小鼠第 60 天旷场试验结果比较

Fig. 3 The result of Open Field Test of mouse pups at PND60

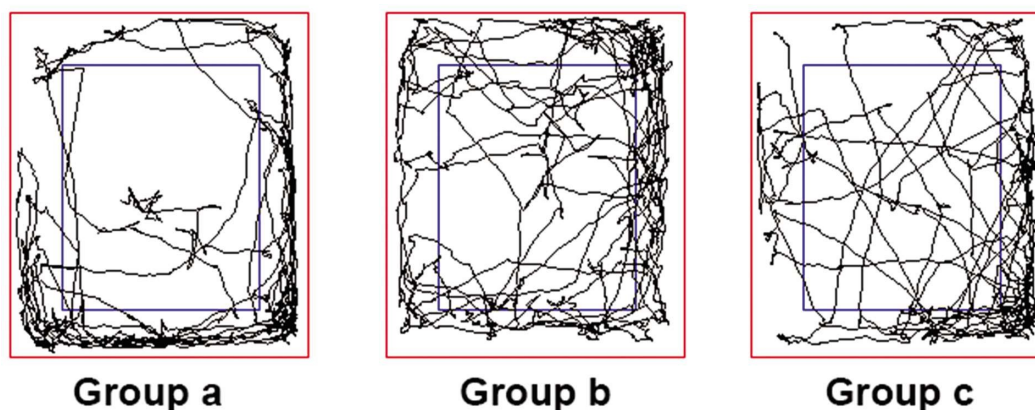


图 4 60 天小鼠旷场运动路线图

Fig. 4 Mouse Field Movement Roadmap at PND60.

2.2.2 学习记忆能力检测 采用 Morris 水迷宫实验(Morris Water Test)评价子代小鼠学习、探索功能受孕期维生素 D 缺乏的影响程度。

比较子代小鼠 Morris 水迷宫实验中穿越平台次数发现, 补充组(a 组, $n=10$) 第 24 天次数为 2.38 ± 0.09 , 第 60 天次数为 1.70 ± 0.18 , 二者之间差异显著($t=3.405$, $P=0.009$); 缺乏组(b 组

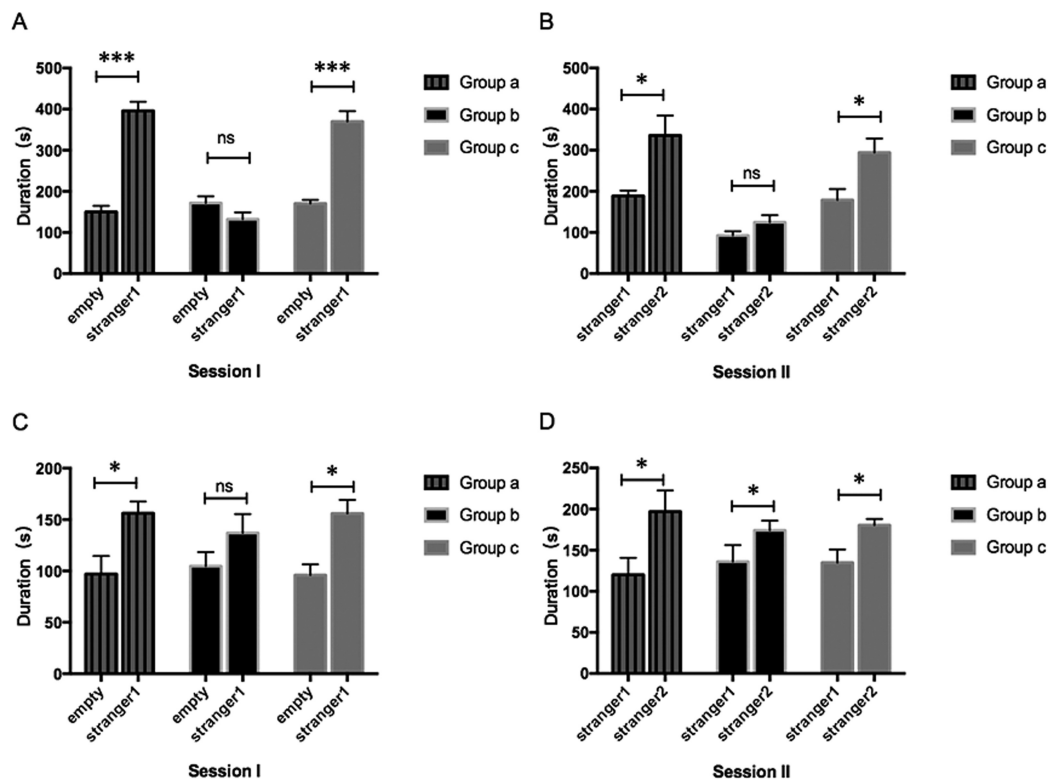


图5 子代小鼠第24天(A, B)和第60天(C, D)社交行为实验结果。社交(session I)和偏好(session II)

Fig. 5 Comparison of social (session I) and preference (session II) in behavioral social experiments at PND24 (A, B) and PND60 (C, D) of the offspring

组, $n=10$)第24天次数为 1.92 ± 0.18 , 第60天次数为 0.91 ± 0.17 , 二者之间差异显著($t=4.07$, $P=0.004$); 正常组(c组, $n=10$)第24天次数为 2.30 ± 0.07 , 第60天次数为 1.51 ± 0.21 , 二者之间差异显著($t=3.494$, $P=0.008$)。

比较子代小鼠 Morris 水迷宫实验中在平台停留时间发现, 补充组(a组, $n=10$)第24天次数为 6.28 ± 0.46 , 第60天次数为 8.30 ± 0.39 , 二者之间差异显著($t=3.351$, $P=0.01$); 缺乏组(b组, 第24天次数为 4.42 ± 0.31 , 第60天次数为 5.85 ± 0.76 , 二者之间差异不显著($t=1.747$, $P=0.119$); 正常组(c组, $n=10$)第24天次数为 5.42 ± 0.52 , 第60天次数为 7.79 ± 0.40 , 二者之间差异显著($t=2.88$, $P=0.02$)。

2.2.3 社交行为检测 采用三箱实验比较子代小鼠在社交(session I)方面的变化, 评价子代小鼠社交行为受孕期维生素D缺乏的影响程度。

第24天社交结果(图5A)显示, 补充组(a组, $n=5$)小鼠与陌生小鼠1(stranger1)接触的时间明显多于空笼子(empty), 二者之间差异显著($t=9.414$, $P<0.001$); 缺乏组(b组, $n=5$)小鼠接触接触 empty 的时间略大于 stranger1, 二者之间差异不显著($t=1.719$, $P=0.124$); 正常组(c组, $n=5$)小鼠与 stranger1 接触的时间明显多于 empty, 二者之间差异显著($t=7.518$, $P<0.001$)。

第60天社交结果(图5C)显示, 补充组(a组, $n=5$)小鼠与 stranger1 接触的时间明显多于 empty, 二者之间差异显著($t=2.828$, $P=0.022$); 缺乏组(b组, $n=5$)小鼠接触接触 empty 的时间略大于 stranger1, 二者之间差异不显著($t=1.944$, $P=0.124$); 正常组(c组, $n=5$)小鼠与 stranger1 接触的时间明显多于 empty, 二者之间差异显著($t=2.683$, $P=0.028$)。

3 讨论

已有报道表明, 人类和小鼠的神经生物学的发育阶段有一定的对应关系, 小鼠胚胎的第18天以及产后的11天分别对应于人类大脑发育三个阶段的分界线^[2]。本实验通过控制小鼠饮食延长维生素D缺乏的时间, 涵盖了小鼠大脑发育的三个关键时期。

本研究首先采用旷场实验来监测不同维生素D水平的子代小鼠在陌生环境中的运动和探究行为以及其焦虑反应。旷场实验是评价动物行为的经典手段, 动物的兴奋性反映于其运动的总路程, 兴奋性越低则运动总路程越短^[23]; 动物对空间的认知能力反映于其在中央区停留时间的长短, 认知越差则时间越长, 正常小鼠对于明亮、开放的中央区具有先天性的躲避倾向。实验所得数据与我们的实验预期一致。

其次采用 Morris 水迷宫实验来检测孕期维生素D缺乏对子代小鼠学习记忆的影响。Morris 水迷宫的检测指标包括穿越平台的次数以及时间, 被广泛应用于研究脑学习记忆机制。检测结果表明孕期维生素D缺乏不同程度的影响了子代的学习、记忆能力。这与多数国内外学者得出的结论相符^[24-26]。

再次通过“三箱”实验来检测孕期维生素D缺乏对子代小鼠社交行为的影响。小鼠是天然的群居动物, 并对新事物有好奇探索天性, 小鼠通过交往来传递信息, 社交对于小鼠有重要作用。社交试验正是基于该原理, 通过检测小鼠在社交方面的变化, 判断其是否存在社交行为障碍。包括抑郁症、自闭症、精神分裂以及强迫症等在内的精神疾病都有社交行为障碍的特征。实验结果说明子代小鼠维生素D缺乏时会对其早期的社交产生一定影响, 对子代早期产生的影响大于成年后。

Yates 等^[27]对小鼠成年雄性后代用社交互动测试来评估社交行为得出的结论亦支持本观点。

综上,本研究探查了维生素 D 缺乏对小鼠行为及神经化学物质的影响,发现向维生素 D 缺乏的子代小鼠补充维生素 D 能够对子代小鼠的兴奋性、空间认知能力、学习记忆能力和社交行为产生良性影响,在发育早期进行维生素 D 补充具有重要的预防作用。研究的不足之处在于我们只选择了 BALB/c 小鼠并且在单一的环境中对其进行检测,下一步的研究将着眼于不同品系的小鼠以及不同性别的子代小鼠,探究不同的孕期阶段发生维生素 D 缺乏对产前产后子代小鼠中枢神经系统及社交行为的影响。

参考文献(References)

- [1] Hobel CJ. Vitamin D supplementation should be routine in pregnancy: FOR: Recent research supports routine vitamin D supplementation in pregnancy[J]. BJOG, 2015, 122(7): 1021
- [2] Vinkhuyzen AAE, Eyles DW, Burne TH, et al. Gestational vitamin D deficiency and autism spectrum disorder [J]. BJPsych Open, 2017, 3(2): 85-90
- [3] Abrams SA. In utero physiology: role in nutrient delivery and fetal development for calcium, phosphorus, and vitamin D [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(2): 604S-607S
- [4] Mullins C, Fishell G, Tsien R. Unifying Views of Autism Spectrum Disorders: A Consideration of Autoregulatory Feedback Loops [J]. Neuron, 2016, 89(6): 1131-1156
- [5] Zhu P, Tong SL, Hao JH, et al. Cord blood vitamin D and neurocognitive development are nonlinearly related in toddlers [J]. J Nutr, 2015, 145(6): 1232-1238
- [6] Eggemoen AR, Falk RS, Knutsen KV, et al. Vitamin D deficiency and supplementation in pregnancy in a multiethnic population-based cohort[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2016, 16(1): 7
- [7] Van Weert B, Van den Berg D, Hruđey EJ, et al. Is first trimester vitamin D status in nulliparous women associated with pregnancy related hypertensive disorders[J]. Midwifery, 2016, 34(1): 117-122
- [8] Dawodu A, Saadi HF, Bekdache G, et al. Randomized controlled trial (RCT) of vitamin D supplementation in pregnancy in a population with endemic vitamin D deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(6): 2337-2346
- [9] Allen KL, Byrne SM, Kusel MM, et al. Maternal vitamin D levels during pregnancy and offspring eating disorder risk in adolescence[J]. Int J Eat Disord, 2013, 46(7): 669-676
- [10] Akbari S, Khodadadi B, Ahmadi S A Y, et al. Association of vitamin D level and vitamin D deficiency with risk of preeclampsia: A systematic review and updated meta-analysis[J]. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, 2018, 57(2): 241-247
- [11] Zhang Qingying, Cheng Yan, He Mulan, et al. Effect of various doses of vitamin D supplementation on pregnant women with gestational diabetes mellitus: A randomized controlled trial [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3): 1889-1895
- [12] Chun Soo-Kyung, Shin Sangah, Kim Moon Young, et al. Effects of maternal genetic polymorphisms in vitamin D-binding protein and serum 25-hydroxyvitamin D concentration on infant birth weight[J]. Nutrition, 2017, 35(1): 36-42
- [13] Kovacs, Christopher S. Bone metabolism in the fetus and neonate[J]. Pediatric Nephrology, 2014, 29(5): 793-803
- [14] Mutlu Mehmet, Sarıaydın Mehmet, Aslan Yakup et al. Status of vitamin D, antioxidant enzymes, and antioxidant substances in neonates with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. J. Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(14): 2259-2263
- [15] Saccone D, Asani F, Bornman L. Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics [J]. Gene, 2015, 561(2): 171-180
- [16] Jones A P, D'Vaz N, Meldrum S, et al. 25-hydroxyvitamin D3 status is associated with developing adaptive and innate immune responses in the first 6 months of life[J]. Clin. Exp Allergy, 2015, 45(1): 220-231
- [17] Hornsby E, Pfeffer P E, Laranjo N, et al. Vitamin D supplementation during pregnancy: Effect on the neonatal immune system in a randomized controlled trial [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018, 141(1): 269-278
- [18] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(4): 1153-1158
- [19] Eyles D, Almeras L, Benech P, et al. Developmental vitamin D deficiency alters the expression of genes encoding mitochondrial, cytoskeletal and synaptic proteins in the adult rat brain [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007, 103(3-5): 538-545
- [20] Vinkhuyzen A A E, Eyles D W, Burne T H J, et al. Gestational vitamin D deficiency and autism-related traits: the Generation R Study[J]. Molecular Psychiatry, 2018, 23(2): 240-246
- [21] Zhu H, Wagner C. Maternal vitamin D supplementation and cord blood genome-wide DNA methylation analysis [J]. Vitamin D Workshop, 2016, 3(1): 29-31
- [22] Cui X, Gooch H, Groves NJ, et al. Vitamin D and the brain: Key questions for future research [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 148(1): 305-309
- [23] Walsh R N, Cummins R A. The Open-Field Test: A critical review[J]. Psychological Bulletin, 1976, 83(3): 482-504
- [24] Fu L, Chen Y H, Chen X, et al. Vitamin D deficiency impairs neurobehavioral development in male mice [J]. Physiology & Behavior, 2017, 179(1): 333-339
- [25] Pan Pauline, Jin Daniel H S, Chatterjee-Chakraborty Munmun, et al. The effects of vitamin D₃ during pregnancy and lactation on offspring physiology and behavior in sprague-dawley rats [J]. Dev Psychobiol, 2014, 56(1): 12-22
- [26] Abreu D A F D, Nivet E, Baril N, et al. Developmental vitamin D deficiency alters learning in C57Bl/6J mice [J]. Behavioural Brain Research, 2010, 208(2): 0-608
- [27] Yates N J, Tesic D, Feindel K W, et al. Vitamin D is crucial for maternal care and offspring social behaviour in rats [J]. Journal of Endocrinology, 2018, 237(2): 73-85