

咖啡因和可口可乐对小鼠的亚急性行为学效应

杨 迎 戴 寅 张均田* 徐晋康

(卫生部食品卫生监督检验所)

摘要 以咖啡因和可口可乐作为刚断乳小鼠唯一饮用水源喂养6周,其平均咖啡因摄入量为6.12—86.23mg/kg,不影响动物生长发育、被动回避反应及全脑DNA、RNA、蛋白质的含量,未见明显的病理学改变。但中剂量组小鼠昼夜活动量增加,同时脑中单胺类递质含量有所变化,提示小鼠的行为学效应与脑中单胺类神经递质含量有关。

关键词: 咖啡因 可口可乐 亚急性行为学效应 脑合成代谢 单胺类神经递质

在前述急性行为学研究的基础上,观察了咖啡因和可口可乐对刚断乳小鼠为期六周的亚急性行为学效应,并辅以一些神经生化及病理学指标的观察,以便进一步为咖啡因和可口可乐的安全性评价和合理饮用提供依据。

材料与方 法

(一) 常规毒理学观察

中国医科院动物中心提供刚断乳昆明种小鼠150只,体重7—11g。动物按体重随机分五组,每组30只,雌雄各半。A组给自来水、B组给予纯咖啡因0.1mg/ml, C、D、E组则分别给含咖啡因0.025、0.1、0.4mg/ml的可口可乐汁(自来水稀释),以此作为动物整个试验期唯一的饮用水来源,各组动物均喂L₁营养饲料(中国医学科学院动物中心提供)。每天记录动物的液体摄取量,每周称饲料、体重一次,并计算食物利用率和咖啡因摄入量。喂养6周后,进行各项行为学指标的测定,然后选40只小鼠(每组8只,雌雄各半),称体重后处死,小心取出各脏器,用滤纸擦干后称重,计算脏器比值,将心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胃、12指肠、大脑、睾丸(或卵巢)等脏器用10%福尔马林固定,进行病理组织学检查,各组随机取二只雌性小鼠,在大脑前区皮质取

材,做超薄切片电镜下观察皮质神经元和神经纤维的超微结构变化。

(二) 行为学效应

1. 各组随机抽取10只小鼠(雌雄各半)进行跳台法和避暗法实验^{[1]—[3]},以观察在较长期给予咖啡因和可口可乐喂养时,对小鼠记忆获得过程的影响。

2. 各组随机抽取10只小鼠(雌雄各半)同急性行为学效应所述三光道小鼠活动计数器测定小鼠白昼及夜间自主性活动,前5min作为动物适应期,后10min的活动次数用来进行统计分析。

(三) 小鼠全脑DNA、RNA和蛋白质含量的测定

各组随机抽取8只小鼠(雌雄各半)共40只,断头后迅速取出全脑,去小脑称重(此两步为冷操作)后放入具塞离心管内按1:10加入冰冻生理盐水,用匀浆器快速打匀,取10%动物脑匀浆1ml按Folch^[4]法提取后,上清液按苔黑酚法^[5]测RNA含量,按二苯胺法^[5]测DNA,沉淀则按Lowry法^[5]测蛋白质。

(四) 小鼠脑内单胺类神经递质的测定^[6]

各组随机抽取雄性小鼠6只,按HPLC法测脑内去甲肾上腺素(NE)、多巴胺

*中国医科院药物研究所

(DA)、5-羟色胺 (5-HT) 及其代谢产物3, 4-二羟苯乙酸 (DOPAC)、高香草酸 (HVA) 和5-羟吲哚乙酸 (5HIAA)

等的含量。

结果与讨论

表 1 咖啡因和可口可乐对小鼠跳台法记忆获得过程的影响

组 别	剂 量 (mg/kg)	错 误 次 数		潜 伏 期 (秒)	错误反应率 (%)
		训 练	测 验		
A(对照)	0	2.0±1.1	0.5±1.0	125.0±74.8	30
B(咖啡因)	24.19	2.5±1.1	0.0±0.0	180.0±0.0	0
C(可口可乐)	6.12	2.0±1.3	1.0±1.9	139.5±63.6	40
D(可口可乐)	28.42	2.5±1.3	0.7±0.8	133.5±58.4	50
E(可口可乐)	86.23	2.2±1.8	0.2±0.4	165.5±36.6	20

表内数字: X±SD

表 2 咖啡因和可口可乐对小鼠避暗法记忆获得过程的影响

组 别	剂 量 (mg/kg)	潜 伏 期 (秒)		错 误 次 数	错误反应率 (%)
		训 练	测 验		
A(对照)	0	40.6±27.1	188.6±115.4	0.9±1.2	60
B(咖啡因)	24.19	44.6±32.3	177.3±101.6	1.1±0.7	80
C(可口可乐)	6.12	61.1±76.5	222.8±108.2	0.6±0.7	40
D(可口可乐)	28.42	42.0±25.3	226.8±112.7	0.9±1.4	40
E(可口可乐)	86.23	84.4±92.6	265.1±49.9	0.4±0.5	40

表内数字为X±SD

表 3 咖啡因和可口可乐对小鼠全脑DNA、RNA和蛋白质含量的影响 (mg/g湿组织)

组 别	剂 量 (mg/kg)	DNA	RNA	蛋白质
A(对照)	0	1.7±0.1	3.3±0.2	67.7±5.9
B(咖啡因)	24.19	1.6±0.1	3.4±0.1	66.8±15.0
C(可口可乐)	6.12	1.6±0.1	3.4±0.1	62.4±6.6
D(可口可乐)	28.42	1.7±0.1	3.4±0.2	63.1±5.6
E(可口可乐)	86.23	1.7±0.1	3.4±0.2	65.2±5.3

表内数字为X±SD

表 4 咖啡因和可口可乐对动物昼夜活动量的影响

组 别	剂 量 (mg/kg)	白 天	夜 间
A(对照)	0	230.2±78.8	326.3±119.3
B(咖啡因)	24.19	269.7±66.2	348.5±131.3
C(可口可乐)	6.12	298.7±76.7	420.7±112.6
D(可口可乐)	28.42	313.8±96.4*	470.4±106.67*
E(可口可乐)	86.23	264.3±123.5	420.3±179.3

表内数字为X±SD *与对照组相比P<0.05

表 5 咖啡因和可口可乐对小鼠脑内单胺类递质含量的影响

组 别	剂 量 (mg/kg)	去甲肾上腺素 (NE)	多巴胺 (DA)	5-羟色胺 (5-HT)	3, 4-二羟 苯乙酸 (DOPAC)	高香草酸 (HVA)	5-羟吲哚乙酸 (5HIAA)
A(对照)	0	0.87±0.07	5.09±0.53	1.74±0.17	0.44±0.08	0.52±0.08	1.76±0.36
B(咖啡因)	24.19	0.77±0.05*	4.45±0.25*	1.58±0.14	0.43±0.08	0.51±0.05	1.86±0.13
C(可口可乐)	6.12	0.84±0.07	4.62±0.24	1.70±0.10	0.44±0.06	0.46±0.07	1.72±0.23
D(可口可乐)	28.42	0.78±0.05*	4.97±0.45	1.58±0.15	0.45±0.05	0.50±0.03	1.54±0.16
E(可口可乐)	86.23	0.84±0.09	4.76±0.49	1.72±0.12	0.41±0.02	0.45±0.04	1.59±0.16

表内数字为X±SD

*与对照组比较 P<0.05

根据六周喂养试验的结果, 饮用纯咖啡因和不同浓度可口可乐的各组小鼠, 咖啡因的摄入量平均每天为: B组24.19mg/kg, C组6.12mg/kg、D组28.42mg/kg、E组86.23mg/kg, 较长期摄入上述剂量的咖啡因或可口可乐对小鼠液体摄入量、体重、食物利用率、脏体比值的影响在统计学上均无显著性意义。此与张学明等人的研究结果一致^[7]。关于咖啡因对动物体重的影响, 许多学者做了大量的研究, 包括在动物出生前后给予不同浓度的咖啡因, 发现在一定的剂量范围内, 对动物体重影响很小或无明显的影响^{[8]—[11]}。有人认为在给予较高剂量咖啡因时, 动物液体摄入量增加^[12], 但本实验在给予小鼠相当于86.23mg/kg/天咖啡因含量的可口可乐时, 其液体摄入量无明显增加, 其原因可能是因为可口可乐浓缩汁偏酸(PH=2.52), 不适口, 动物不喜饮用的缘故。

各组肉眼观察、病理组织学检查均未发现明显改变。电镜观察时, 在高剂量可口可乐组(相当于含咖啡因86.23mg/kg)与其他几个组相比, 其突触前区突触小泡显著增多, 密集地充满树突末梢, 已知突触小泡中含乙酰胆碱递质, 胆碱能突触(主要是M型)可能是记忆贮存的内在系统之一^[13], 虽有报道指出咖啡因有拮抗吗啡对大鼠大脑皮质乙酰胆碱释放的抑制作用^[14], 硫酸安非他明还有提高大鼠脑内胆碱脂酶活力的作用^[15], 但由于样本数少, 且缺乏相应的动物脑内乙酰胆碱含量的资料, 还不能作出实质性的结论。

由表1、表2可见, 长期摄入以上剂量的咖啡因和可口可乐, 不影响小鼠一次性被动回避反应(跳台法、避暗法)记忆获得过程, 这与File^[18]的研究结果比较相似, 他在大鼠出生后第一周每天给予15、30mg/kg的咖啡因, 而在出生后第39、40天进行避暗

法被动回避实验, 发现不影响动物记忆过程。Butcher^[16]及Sinton^[17]也有类似的报道。

Ewert^[18]认为: 神经线路(短时记忆)的活动可能促使合成信使RNA, 后者参与蛋白质合成(可能贡献给长期记忆), 对这个问题进行实验探索, 基本上有三种途径: ①在一定学习阶段前和当中, 研究脑中蛋白质合成活动; ②研究学习和施加抑制RNA或蛋白质合成的物质之间的可能相关性; ③把受训练动物的脑抽提物注射给未受训练的动物, 在急性行为学效应研究中我们已就②进行了探讨, 这里通过测量小鼠全脑DNA、RNA和蛋白质含量进一步研究咖啡因和可口可乐影响动物学习记忆过程的作用机制, 由表3可见, 经统计学处理, 各组间DNA、RNA和蛋白质含量无明显差异($P>0.05$)。此与Sobotka^[19]的报道一致, 联系前述结果, 说明较长期摄入上述剂量的咖啡因和可口可乐, 不影响动物生长发育、脑神经发育和生物大分子的合成代谢, 也为解释长期喂养影响小鼠学习记忆过程提供了生化学基础, 推测如果进一步对小鼠脑中这几种单胺类神经递质进行分区测定, 也许会发现某种差别^[11]。

由表3可见, D组(相当于含28.42mg/kg咖啡因的可口可乐组)自主性活动量在白天和夜间均较对照组为高, 差异有显著性意义, 此与许多在孕期或哺乳期给予咖啡因而引起动物活动量增加的报道相似^{[17][19][23]}。

A组(水对照组)白天和夜间活动量比较, 夜间自主性活动量明显高于白天, 这与Kallman^[24]的报道一致, 他发现1月龄及5月龄SD大鼠夜间活动量均高于白天, 但未见在咖啡因较长期慢性喂养试验中动物昼夜活动量比较的报道, 此结果符合小鼠为夜间活动动物的生理特点, 也说明受试物对昼夜不同

兴奋状态小鼠活动量的影响作用基本一致。

由表4可见,小鼠脑内单胺类递质测定的结果,除B组NE、DA和D组的NE含量明显低于对照组外($P < 0.05$)余各组与对照组相比较,差异无统计学意义。

长期以来人们对于咖啡因所引起的行为学效应的生理和生化学机制做过大量的研究,这些实验大多以动物活动量的变化作为行为学观察指标。目前人们比较趋向于腺苷酸中介物学说^[25]。首先咖啡因作为一种拮抗剂竞争并阻断腺苷酸受体^{[26]—[28]},从而使细胞内C—AMP浓度增加,或抑制磷脂二脂酶^{[27]、[29]},使得C—AMP的分解代谢下降,细胞内C—AMP含量随之升高。C—AMP是一种具有广泛生理生化活性的物质,它可以直接影响多种激素如去甲肾上腺素、多巴胺、组胺、5—羟色胺的活性,从而与机体整个代谢过程和生理过程密切相关,并产生行为学效应。很多研究发现:在长期慢性给予咖啡因时(如在出生前开始给予),仔鼠脑内NE含量无明显改变^{[9]、[18]、[30]},DA浓度反而下降^{[30]、[31]},此被认为是咖啡因在长期通过前述机制使C—AMP含量增高的同时使DA耗竭,由于目前已知DA为一种抑制性中枢神经递质^[32],故DA浓度下降,中枢兴奋性增加,可能是使发育中的动物活动量增高的原因。本实验发现24.19mg/kg咖啡因组DA含量显著下降与这种观点相吻合。虽然亦认为NE为一种抑制性中枢神经递质,但目前尚无更多的实验资料证实,从本实验结果看,24.19mg/kg咖啡因组和相当于28.42mg/kg咖啡因含量的可口可乐组NE含量明显下降,同时后者动物昼夜活动量均显著提高,可初步证实这种假说。

总之,从本实验结果看,2mg/kg的可口可乐不仅对动物行为没有损害作用,相反在一定程度上能改善大、小鼠的学习记忆过程,且不引起动物活动量等方面的改变,以

此作为适宜的摄入量水平是可以接受的。若按市售瓶装可口可乐的咖啡因含量^[25],此剂量相当于60kg体重成人每天饮用4—6瓶(每瓶192ml)或30kg体重儿童(约10岁)每天饮用2—3瓶;本实验发现对机体行为有影响的最低有作用剂量为20mg/kg咖啡因或相当于此含量的可口可乐,等于或高于此剂量的咖啡因和可口可乐可短暂干扰小鼠记忆获得过程,引起动物昼夜活动量增高及脑内单胺类神经递质的变化,达到此最低有作用的饮用瓶数在60kg体重成人每天44—60瓶(约8.4—11.5kg饮料),在30kg体重儿童则为22—30瓶(约4.2—5.8kg饮料)。此值约为人每天最高液体摄取量的4倍(包括人体新陈代谢所产生的水),显然日常生活中不可能达到,尽管如此,要想全面评价咖啡因及可乐型含咖啡因饮料的安全性,还应考虑其他毒理学实验的结果并进一步做其慢性行为学尤其是在动物出生前后给予咖啡因的行为致畸学研究,并考虑从动物实验结果外推到人的安全系数。

参考文献

1. 张均田、斋藤洋,药学报 21(1): 12—7, 1986
2. 张秀娟、张均田,药学报 21(10): 731—5, 1986
3. 谭文竹、张均田,中国医药报 8(5): 366—70, 1986
4. Folch, J.M., et al. J. Bio. Chem. 226: 497—509, 1957
5. 蔡武城、袁厚,生物物质常见化学分析法 科学出版社, P93—121, 1982
6. 屈志伟、刘云、张均田,中国医学科学院学报 9(5): 371—5, 1987
7. 张学明、刘志诚,可口可乐的行为毒理学研究,中华医学会第二届全国食品卫生学术会议交流资料, 1987
8. File, S.E. Neurotoxicol. Teratol. 9(1): 9—16, 1987
9. Concannon, J.T., et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 226(3): 673—9, 1983
10. Estler, C.J., et al. Psychopharmacology 58: 161—166, 1978
11. Yazdani, M. Dev. Pharmacol. Ther. 11: 102—108, 1988
12. Gerald, L.W., et al. Neurobehav. Toxicol. Tera Tol., 8: 20

(下转21页)