

# 早期咖啡因暴露对成年小鼠苦味适应的影响

刘斯斯<sup>1</sup>,李伟丽<sup>1</sup>,李国梁<sup>1</sup>,陈梦玲<sup>2</sup>,张根华<sup>1,2</sup>

(1. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院,江苏 苏州 215123)  
(2. 常熟理工学院食品与生物工程学院,江苏 常熟 215500)

[摘要] 咖啡因是一种典型的苦味刺激物,常作为一种心理刺激药物被广泛应用. 通常而言,人们对咖啡因的感知是厌恶的,但这种感知可以被后天的经历所影响. 我们的实验结果表明,在小鼠出生后早期阶段对其进行慢性咖啡因暴露,可以影响其成年阶段对咖啡因的感知模式,并提高其对咖啡因的厌恶阈值,即早期咖啡因暴露使成年小鼠对咖啡因的苦味适应性增强.

[关键词] 咖啡因,小鼠,TBPs,偏好,适应

[中图分类号]Q189 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2013)01-0079-06

## The Influence of Bitter Adaptation in Adulthood Induced by Early Postnatal Exposure to Caffeine

Liu Sisi<sup>1</sup>,Li Weili<sup>1</sup>,Li Guoliang<sup>1</sup>,Chen Mengling<sup>2</sup>,Zhang Genhua<sup>1,2</sup>

(1. College of Preclinical Medicine and Biological Science,Soochow University,Suzhou 215123,China)  
(2. College of Biology and Food Science,Changshu Institute Technology,Changshu 215500,China)

**Abstract:**Caffeine is a prototypic bitter stimulus and is consumed as psychoactive stimulant widely. Customarily,people present aversion to caffeine. But the taste preferences can be affected by postnatal experience. Our research indicates that chronic administration of caffeine for mice at early developmental stage may influence the adult caffeine sensory. According to the behavioral test,we observed that the avoid thresholds for caffeine had been increased. Early postnatal exposure to caffeine increases the bitter adaptation in adulthood of ICR mice.

**Key words:**caffeine,mouse,TBPs,preference,adaptation

味觉偏好具有很大的个体差异性,目前研究认为遗传差异仅仅是形成食物偏好的部分原因<sup>[1]</sup>,后期经验的学习对味觉的功能与偏好的形成具有重要的、甚至决定性的影响<sup>[2,3]</sup>. 一般来说,味觉偏好具有很强的遗传特性:人类天生喜好具有甜味、鲜味和咸味的食物,而对苦味和酸味则产生厌恶感<sup>[4]</sup>. 对前者的喜爱被认为代表不同营养或生理上的需求,而对后者的厌恶则能避免饮食上潜在的危险. 然而,从某种程度上来说,外周味觉敏感性的遗传差异是可以被后天的饮食经历和营养成分所修正的<sup>[5]</sup>. 有文献报道,早期对某种物质的暴露和学习,会影响后期嗅觉和味觉系统对这种物质的识别和喜好程度<sup>[4]</sup>. 例如许多苦味物质:茶、咖啡和啤酒,人们在逐渐学习的过程中能接受甚至喜欢它们. 同样,在一些经验的引导下,人们也会喜好一些苦味蔬菜<sup>[4,6,7]</sup>. 当对啮齿类或昆虫类动物持续暴露某些苦味物质时,会使其对这种苦味物质产生一定的适应性<sup>[8,9]</sup>.

咖啡因是一种生物碱,存在于咖啡、绿茶等多种饮料中,它具有促进新陈代谢、兴奋神经中枢、促进脂肪分解的作用<sup>[10]</sup>. 目前关于咖啡因的研究多集中于其生理和药理方面,对于咖啡因的味觉感知则较少. 本实验以 ICR 小鼠作为动物模型,在其出生后早期对其进行不同浓度的咖啡因口腔暴露,然后观察其成年小鼠对系列浓度梯度的咖啡因溶液的偏好模式与偏好程度(偏好率)的变化,探究早期咖啡因暴露对成年小鼠苦味适应的影响.

# 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 实验动物

本实验对象为出生后 21 d(P21)的雄性 ICR 小鼠,购自苏州大学实验动物中心. 本研究的动物实验依照《中华人民共和国实验动物管理条例》和《苏州大学实验动物管理办法》实施执行. 动物房室温控制在 $(22\pm1)^{\circ}\text{C}$ ,湿度为 50%,照明时间为光照 12 h、黑暗 12 h(8:00~20:00 开灯)的日夜循环交替,笼中消毒垫料每周更换 2~3 次,自由饮用去离子水和食物<sup>[11]</sup>.

### 1.1.2 主要试剂及溶液配制

咖啡因(Caffeine):Alfa Aesar-A Johnson Matthey Company,USA;

去离子水:常熟理工学院生物与食品工程学院实验室;

繁育饲料:苏州大学实验动物研究中心;

双瓶喜好测试(Two Bottle Preference,TBP;动物行为学方法)所用咖啡因的浓度梯度为:(0.1、0.2、0.5、1、2.5、7.5、10、12.5、15)mmol/L<sup>[12]</sup>,稀释方式为去离子水溶解相应重量的咖啡因试剂.

### 1.1.3 主要设备

测试管:用血清移液管(COSTAR,USA;25 mL,Non-pyrogenic)改造<sup>[13]</sup>,具体操作为:双管做好标记(对照组与实验组),然后并排用皮筋固定放置于鼠笼左侧,双管尖部相距 15 mm,管尖伸入笼子 25 mm,管尖出口直径为 3.2 mm,使小鼠容易舔吸液体.测试前用双管去离子水进行 1 周适应<sup>[11]</sup>.图 1 所示实验时所用设备.

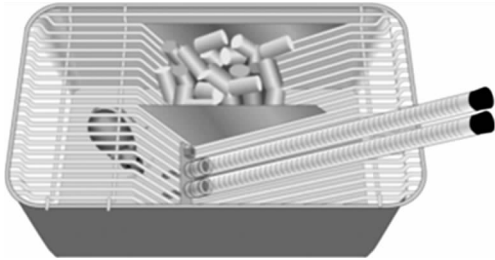


图 1 TBP 测试示意图

Fig.1 The Schematic diagram of TBP test

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 小鼠分组

将购买的雄性 ICR 小鼠分别进行如下分组:对照组(饮用去离子水),200 mg/L 咖啡因暴露组,500 mg/L 咖啡因暴露组,750 mg/L 咖啡因暴露组,各组分别为 15 只小鼠.

### 1.2.2 前期暴露及 TBP 测试

对照组小鼠喂食去离子水,而实验组小鼠喂食特定浓度的咖啡因溶液进行口腔暴露.等小鼠长到成年期(出生后第 8 周)后,进行 TBP 测试实验,测试期间均喂食正常饲料并自由饮食.从实验分组开始,每周对小鼠体重进行 1 次称量.

暴露的方式:在小鼠饮水瓶中加入去离子水(对照组)或特定浓度的咖啡因溶液(实验组),让小鼠自由饮用,持续暴露 3 周,目的是让小鼠口腔舌面接受咖啡因刺激,然后改为双管饮水,使其适应 1 周后进行 TBP 测试.

TBP 测试方法与设备参照美国莫内尔化学感官研究中心(Monell Chemical Senses Center)的推荐方法<sup>[13]</sup>.具体的操作方法为:在 TBP 测试开始前一周用双管喂食去离子水,使小鼠适应双管一周.到第 8 周时,将小鼠单鼠单笼正常饲养,然后一管中加入某个浓度的咖啡因溶液,一管加入去离子水,使 2 管内溶液量保持一致,并排放入固定位置.为了避免位置偏好引起的误差,每 24 h 交换双管位置,每个咖啡因浓度测试 48 h,测量时浓度从低到高.在不同浓度之间测试时不做间隔,每次换位置前要记录每只小鼠 24 h 时液体的饮用量(咖啡因和水分别记录).TBP 测试阶段,对照组小鼠同暴露组小鼠双管中溶液一致,2 组同时进行.

## 1.3 数据分析方法

统计每个咖啡因浓度每只小鼠 24 h 摄入的咖啡因溶液与去离子水的平均值(mL),偏好率= $(24\text{ h 咖啡因液体的摄入量}/(24\text{ h 咖啡因液体的摄入量}+24\text{ h 去离子水的摄入量}))\times 100\%$ .当小鼠对咖啡因的摄入量显著高于去离子水时,定义为偏好;相反当去离子水的摄入量显著高于咖啡因时,定义为厌恶,产生厌恶现象时咖啡因溶液的最低浓度为厌恶阈值;两者无显著性差异时定义为冷漠<sup>[11]</sup>.

使用数据分析软件 Origin Pro7.0 进行数据统计绘图,所有数据用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示.

对照组与实验组小鼠体重之间的显著性比较采用成对  $T$  检验 (Paired  $t$ -test) 分析. 每组小鼠对每个咖啡因浓度的偏好或厌恶的显著性分析通过对其摄入的咖啡因溶液与去离子水的量进行成对  $T$  检验来确定. 对照组与实验组小鼠在每个咖啡因浓度上的饮用总量 (咖啡因溶液饮用量+去离子水饮用量) 及暴露前后 2 组小鼠对咖啡因偏好率之间的显著性比较采用的是单因素方差分析 (One-way ANOVA), 显著性差异标准为  $P<0.05$ .

2 结果

2.1 各组小鼠体重变化的分析

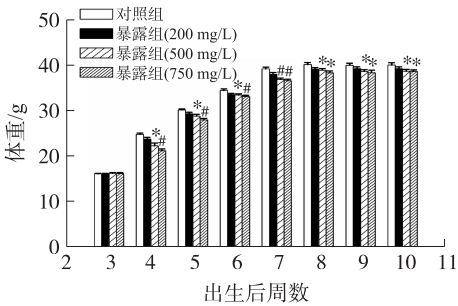
如图 2 所示,在实验初始,各组小鼠之间体重没有差异,平均体重为 16 g 左右. 当用 200 mg/L、500 mg/L、750 mg/L 的咖啡因进行暴露后,200 mg/L 的咖啡因溶液对小鼠的体重没有影响,同对照组相比没有显著性差异,而 500 mg/L、750 mg/L 实验组小鼠的体重显著小于对照组 (各组数据见表 1、图 2), 并且这种差异在整个 TBP 测试阶段仍然存在.

表 1 各组小鼠每周体重统计分析 (g)  
Table 1 The weights of each group recorded for every week

出生周数	对照组	标准差	200 mg/L 暴露组	标准差	500 mg/L 暴露组	标准差	750 mg/L 暴露组	标准差
第 3 周	16.14	0.13	16.11	0.12	16.23	0.20	16.17	0.24
第 4 周	24.76	0.31	23.72	0.38	22.25	0.62	21.21	0.34
第 5 周	30.08	0.23	29.26	0.35	28.78	0.39	27.91	0.35
第 6 周	34.35	0.37	33.48	0.28	33.35	0.32	33.05	0.29
第 7 周	39.12	0.37	37.92	0.39	36.78	0.29	36.53	0.30
第 8 周	40.04	0.46	39.04	0.35	38.82	0.36	38.27	0.37
第 9 周	39.86	0.48	39.15	0.41	38.53	0.37	38.26	0.53
第 10 周	39.96	0.46	39.16	0.37	38.62	0.37	38.55	0.32

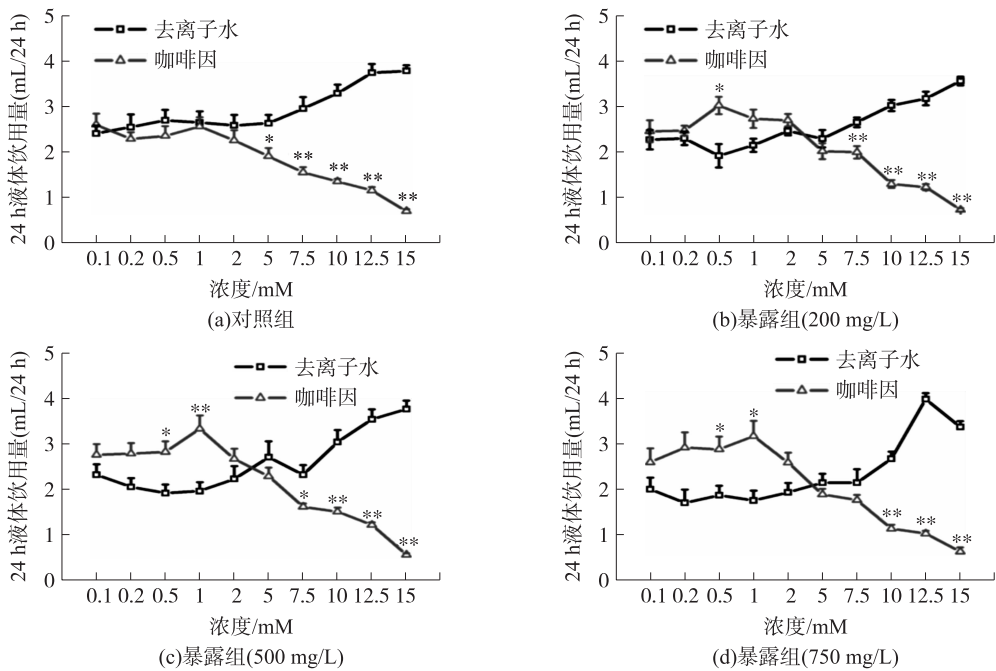
2.2 咖啡因感知模式分析

图 3A 为对照组小鼠 TBP 测试结果,整体来说,对照组成年 ICR 雄性小鼠 24 h 摄入的水比摄入的咖啡因溶液要多,在低浓度时 (0.1 mmol/L ~ 2 mmol/L) 没有显著差异;而在高浓度时 (5 mmol/L ~ 15 mmol/L), 小鼠摄入的水量显著高于咖啡因溶液,因此对照组小鼠对咖啡因的喜好模式为“冷漠-厌恶”模式,出现厌恶阈值的点为 5 mmol/L,并且随着咖啡因浓度的提高,厌恶程度加大. 图 3B、3C、3D 分别为 200 mg/L、500 mg/L、750 mg/L 咖啡因暴露组小鼠行为学测试结果统计. 如图 3B 所示,经过 200 mg/L 咖啡因暴露的小鼠,其成年 ICR 小鼠对 0.5 mmol/L 的咖啡因溶液表现出偏好现象,此时对咖啡因溶液的饮用量显著高于水;对高浓度的咖啡因溶液依然表现出厌恶反应,不过厌恶阈值同对照组相比有所提高,为 7.5 mmol/L. 而用 500 mg/L、750 mg/L 咖啡因进行暴露的小鼠,对咖啡因的偏好浓度为 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L,其厌恶阈值分别为 7.5 mmol/L 和 10 mmol/L,也就是说同 200 组相比,其偏好范围增大,偏好阈值提高,而厌恶阈值同对照组相比也相应地提高. 从图中我们可以清楚地看出, P21 小鼠经过咖啡因口腔暴露后,其成年小鼠对咖啡因溶液的偏好模式发生了改变,偏好模式由“冷漠-厌恶”转变为“冷漠-偏好-冷漠-厌恶”.



各组小鼠体重以平均值±标准误表示;每组实验小鼠为 13 只; \*  $P<0.05$ , #  $P<0.001$   
The data are presented as mean±SEM. N = 13 in each group.  
\*  $P<0.05$ , #  $P<0.01$

图 2 P21 雄性对照组与实验组小鼠体重分析图  
Fig.2 The weights of control and preexposure groups for P21 male mice



实验各数据均用平均值±标准误表示;各组实验小鼠为 13 只; \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

图 3 各组小鼠 24 h 咖啡因与水饮用量分析

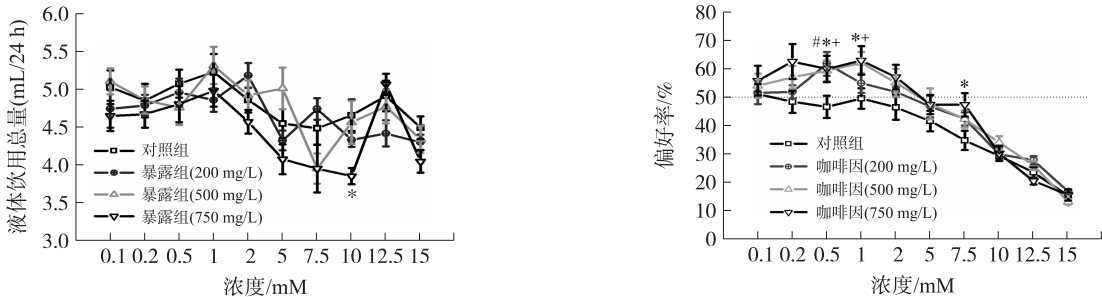
Fig. 3 The solution intake of each group for 24 h

2.3 各组小鼠 24 h 液体饮用总量分析

从图 4 可以看出,除 750 mg/L 咖啡因暴露组小鼠在 10 mmol/L 液体饮用总量显著小于对照组外,其余各实验组小鼠液体饮用总量同对照组小鼠相比并无显著性差异. 结合图 3、4 分析可知,当小鼠对咖啡因溶液饮用量多时,对水的饮用量相对减少;而饮用水多时,咖啡因溶液则减少.

2.4 偏好率分析

图 5 显示了 200 mg/L、500 mg/L、750 mg/L 暴露组与对照组小鼠对咖啡因的偏好率在各个浓度点的比较. 从图中可以看出,各组小鼠对咖啡因的偏好率随着咖啡因浓度的升高而降低. 就对照组而言,成年小鼠对咖啡因的偏好分数均在 50% 以下,由上面分析可知在低浓度时(0.1 mmol/L ~ 2 mmol/L),小鼠 24 h 摄入的水比摄入的咖啡因溶液要多,但没有显著性差异,呈现“冷漠”模式,此时小鼠对咖啡因的偏好分数虽然低于 50%,但都接近 50%,平均值为 48.61%;而在高浓度时(5 mmol/L ~ 15 mmol/L),小鼠摄入的水量显著高于咖啡因溶液,是“厌恶”模式,此时小鼠对咖啡因的偏好分数较低,平均值只有 29.14%. 对于咖啡因暴露组,成年小鼠对咖啡因的偏好模式发生改变,相应的偏好率也发生变化. 在浓度为 0.5 mmol/L 时,200 mg/L、500 mg/L、750 mg/L 3 个咖啡因暴露组的偏好率均显著高于对照组,偏好率的增长率依次



实验各数据均用平均值±标准误表示;各组实验小鼠为 13 只; \*  $P<0.05$

图 4 各组小鼠 24 h 液体饮用总量分析

Fig. 4 The total solution intake (water and caffeine) for 24 h

实验各数据均用平均值±标准误表示;各组实验小鼠为 13 只;#、+、\* 分别代表 200 mg/L、500 mg/L、750 mg/L 咖啡因组相对于对照组的显著性差异,  $P<0.05$

图 5 各组小鼠 48 h 对咖啡因偏好率的分析比较

Fig. 5 Mean preference score from 48 h two-bottle tests comparing the responses to caffeine from control group

为:32.41%、17.76%、28.43%。对于500 mg/L、750 mg/L 咖啡因暴露组来说,咖啡因浓度为1 mmol/L 时,两者的偏好率仍显著高于对照组,分别具有27.16%和26.87%的增长率。另外,在高浓度时,750 mg/L 的暴露组在7.5 mmol/L 浓度点上的偏好率显著高于对照组,偏好率的增长率为34.06%。同对照组不同的是,在低浓度时各个暴露组的偏好分数均在50%以上,只有在较高浓度时(>10 mmol/L)偏好分数才明显低于50%。

### 3 结论与讨论

由上述结果可知,高浓度的咖啡因对小鼠的体重产生影响,500 mg/L、750 mg/L 的咖啡因显著减轻了小鼠的体重,而200 mg/L 的咖啡因对其没有影响。导致这种结果的原因可能是咖啡因作为一种生物碱,在动物机体中发挥着重要作用,对消化系统、内分泌系统等都产生影响。已有文献表明,高浓度的咖啡因会使人产生焦虑、烦躁、失眠、易怒等症状<sup>[14]</sup>,本实验所采用的500 mg/L、750 mg/L 咖啡因溶液可能已经对小鼠的生理功能产生影响。

对P21 雄性小鼠进行咖啡因暴露后会对其成年后对咖啡因的偏好模式:对浓度从低到高的咖啡因溶液,对照组表现出“冷漠-厌恶”模式,而暴露组则呈现出“冷漠-偏好-冷漠-厌恶”模式。从偏好率上我们可以看出,早期的暴露提高了成年小鼠对咖啡因的喜爱程度,在低浓度范围内,暴露组的偏好分数均高于50%,而对照组的则低于50%,其中在0.5 mmol/L 和1 mmol/L 浓度点达到显著性差异。在高浓度范围内,对照组和各暴露组均表现出厌恶反应,但厌恶阈值则不同。对照组、200 mg/L 组、500 mg/L 组和750 mg/L 组的厌恶阈值分别为5 mmol/L、7.5 mmol/L、7.5 mmol/L 和10 mmol/L。可以看出,经过咖啡因暴露后,成年小鼠对咖啡因的厌恶阈值提高,即对咖啡因引起的苦味耐受力增强。

外周味觉感受系统(味蕾及其支配神经)的主要功能是区分和辨别食物中的各种成分<sup>[15]</sup>。咖啡因作为一种典型的苦味物质,能对味觉受体细胞产生多种生理作用,如抑制钾离子通道、提高胞内钙离子水平等<sup>[16]</sup>。当持续暴露咖啡因溶液时,可能对上述通道产生影响,从而导致对咖啡因的适应性增强。目前对于咖啡因感知的具体过程还不清楚,有文献表明由于咖啡因具有很强的脂溶性,所以能直接透过细胞膜,与胞内苦味感知相关蛋白结合,从而对咖啡因产生感知<sup>[17]</sup>。在最近的研究中发现,人类对咖啡因的感知与hTAS2R7、hTAS2R10、hTAS2R14、hTAS2R43、hTAS2R46 几种味觉受体基因相关<sup>[18]</sup>,表明对咖啡因的感知也有可能是通过味觉受体介导的,但具体的机制还需要进一步地研究。

目前的研究表明,苦味适应行为的产生可能存在3 种机制:1. 味觉细胞持续暴露某种苦味物质导致味觉细胞脱敏,即钝化了外周味觉细胞,从而减弱了厌恶反应;2. 介导厌恶反应的神经中枢通路由于持续暴露某种苦味物质,而产生一种适应或习惯;3. 某种积极的饮食效应与特定的苦味物质形成某种关系,导致出现条件性的偏好行为<sup>[19]</sup>。我们的实验结果表明,ICR 小鼠进行早期咖啡因暴露后会对其成年时咖啡因感知产生影响,使其对咖啡因苦味适应增强。小鼠产生这种行为学变化的深层原因,还需从外周味觉感受系统及味觉中枢神经系统进行深入研究,我们的实验结果为后续研究提供了动物模型。

### [ 参考文献 ]

- [1] Drewnowski A, Henderson S A, Barratt-Fornell A. Genetic taste markers and food preferences[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(4):535-538.
- [2] Schaal B, Marlier L, Soussignan R. Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet[J]. *Chem Senses*, 2000, 25(6):729-737.
- [3] Smriga M, Kameishi M, Torii K. Brief exposure to NaCl during early postnatal development enhances adult intake of sweet and salty compounds[J]. *Neuroreport*, 2002, 13(8):2565-2569.
- [4] Mennella J A, Forestell C F, Morgan L. Early milk feeding influences taste acceptance and liking during infancy[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(3):780S-788S.
- [5] Scafani A. Oral, post-oral and genetic interactions in sweet appetite[J]. *Physiol Behav*, 2006, 89(4):525-530.
- [6] Beauchamp G K, Mennella J A. Flavor perception in human infants: development and functional significance[J]. *Digestion*, 2011, 83(1):1-6.

- [7] Forestell C A, Mennella J A. Early determinants of fruit and vegetable acceptance[J]. *Pediatrics*, 2007, 120(6): 1247–1254.
- [8] Harder D B, Maggio J C, Whitney G. Assessing gustatory detection capabilities using preference procedures[J]. *Chem Senses*, 1989, 14(4): 547–564.
- [9] Glendinning J I, Gonzalez N A. Gustatory habituation to deterrent compounds in a grasshopper: concentration and compound specificity[J]. *Anim Behav*, 1995, 50(4): 915–927.
- [10] 陆梦, 张莉, 丁雪瑞, 等. 咖啡因对小鼠空间学习记忆及体重的影响[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2010, 31(5): 648–650.
- [11] 张根华. 甜味偏好可塑性的味觉细胞学基础[D]. 杭州: 浙江工商大学食品与生物工程学院, 2007.
- [12] Laska M, Rivas B R M, Hernandez S L T. Gustatory responsiveness to six bitter tastants in three species of nonhuman primates[J]. *J Chem Ecol*, 2009, 35(5): 560–571.
- [13] Bachmanov A A, Li X, Reed D R, et al. Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus[J]. *Chem Senses*, 2001, 26(7): 925–933.
- [14] Smith P F, Smith A, Miners J. The safety aspects of dietary caffeine: report from the Expert Working Group[R]. Australia: New Zealand Food Authority, 2000.
- [15] Keast R S J, Breslin P A S. Cross adaptation and bitterness inhibition of L-tryptophan, L-phenylalanine and urea: further support for shared peripheral physiology[J]. *Chem Senses*, 2002a, 27(2): 123–131.
- [16] Zhao F L, Lu S G, Herness S. Dual actions of caffeine on voltage-dependent currents and intracellular calcium in taste receptor cells[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 283(1): R115–R129.
- [17] Rosenzweig S, Yao W T, Dasso M, et al. Possible novel mechanism for bitter taste mediated through cGMP[J]. *J Neurophysiol*, 1999, 81(4): 1661–1665.
- [18] Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, et al. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors[J]. *Chem Senses*, 2010, 35(2): 157–170.
- [19] Glendinning J I, Brown H, Capoor M, et al. A peripheral mechanism for behavioral adaptation to specific “bitter” taste stimuli in an insect[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(10): 3688–3696.

[责任编辑: 黄 敏]