

多巴胺 D1、D3 受体敲除及双基因敲除对小鼠体重的影响

张 宝, 刑 博, 魏曙光, 贾小妮, 张洪波, 李生斌

(西安交通大学医学部法医学院卫生部法医学重点实验室, 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西 西安 710061)

【摘要】 目的 研究多巴胺受体介导的神经及生理活动。**方法** 引进多巴胺 D1 和 D3 受体敲除小鼠, 繁育出多巴胺 D1D3 受体双敲除小鼠。选择 D1 受体敲除、D3 受体敲除、D1D3 双基因敲除与 WT 四种基因型雄鼠各 7 只, 对其 30 d、50 d、70 d 小鼠 24 h 内的进食量、饮水量及体重进行测量, 探讨多巴胺 D1 受体、D3 受体敲除小鼠及 D1D3 受体双基因敲除小鼠与野生型进食、饮水、体重增长比较。**结果** 多巴胺 D1、D3 受体基因对小鼠 21 d 和 35 d 的体重增长有一个较为显著的影响, 直到 90 d 时, 各基因型小鼠体重间无统计学差异。**结论** 多巴胺可能通过调节 HPA 轴的活性, 从而调控仔鼠的觅食与饱腹感, 最终影响仔鼠初生重及泌乳期体重。同时, 多巴胺 D1、D3 受体基因的敲除可能通过干扰泌乳等母性行为而影响小鼠的体重。研究结果为利用基因敲除小鼠研究多巴胺 D1、D3 受体的功能及它们之间的相互作用奠定坚实的基础。

【关键词】 多巴胺 D1 受体; 多巴胺 D3 受体; 基因敲除; 体重

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 10-0054-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.010

Effect of DRD1, DRD3 gene knockout and double gene knockout on body weight in mice

ZHANG Bao, XING Bo, WEI Shu-guang, JIA Xiao-ni, ZHANG Hong-bo, LI Sheng-bin

(College of Medicine and Forensics, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of dopamine receptors on neurological and physiological activities. **Methods** Dopamine D1 receptor gene (*DRD1*) knockout mice and dopamine D3 receptor (*DRD3*) gene knockout mice were introduced, and double gene knockout mice were bred in our lab. Seven SPF male mice in each group were used in this experiment. The food intake, water intake, body weight gain for 24 hours were tested on the age of 30 d, 50 d, and 70 d and were compared with those of wild type mice. **Results** *DRD1* gene and *DRD3* gene showed significant effect on the body weight in mice in age of 21 day and 35 day, but at the age of 90 day, the differences became insignificant among the mice of various genotypes. **Conclusions** Dopamine may effect on the foraging and satiety in newborn mice through regulating the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity, and finally leads to a reduced body weight gain in newborn mice and puppies during lactation. Furthermore, *DRD1* gene and *DRD3* gene may influence on body weight of newborn mice through regulating mothers' lactation, lead to a lower body weight at ablactation, and compensatory increase of body weight after ablactation. Our results provide a substantial foundation for studying the function and interaction of

【基金项目】 中国博士后科学基金资助(2013M532056); 陕西省博士后科学基金资助; 中央高校基本科研业务费专项资金(xjj2013052); 西安交通大学国家级大学生创新训练计划。

【作者简介】 张宝(1983-), 女, 研究方向: 法医物证学。E-mail: zhangbao_814@mail.xjtu.edu.cn。

【通讯作者】 李生斌(1957-), 男, 研究方向: 法医基因组学。E-mail: shbinlee@mail.xjtu.edu.cn。

DRD1 and DRD3 genes.

【Key words】 DRD1 gene, DRD3 gene, gene knockout, body weight; Mice

多巴胺是主要的儿茶酚胺类神经递质,它控制着运动、认知、摄食、内分泌调节等多种功能^[1,2]。在脑内,多巴胺主要通过多个神经环路系统发挥作用^[3,4-6]。环路之一即由下丘脑结节漏斗部投射到垂体,多巴胺通过与受体结合调控泌乳素的分泌^[7],从而参与调控机体的生长发育。作为 G 蛋白偶联受体超家族成员,多巴胺受体可分为 D1 样(D1 和 D3)和 D2 样(D2、D3 和 D4)两大类。研究发现多巴胺通过与受体结合对食物相关信号刺激、瘦素、生长激素释放肽及其它影响该系统活性的食欲相关调节因子产生应答。

多巴胺 D1 或 D3 受体的拮抗剂与其它 D1 样或 D3 样受体存在一定的选择性结合^[8,9],很难区分不同受体的功能及它们间的相互作用。直至 90 年代出现敲除小鼠模型后,多巴胺 D1、D3 受体介导的许多行为特性才得以发现^[10]。为深入的研究多巴胺受体介导的神经及生理活动,我校法医学实验室从芝加哥大学引进以 C57BL/6 为遗传背景的多巴胺 D1 受体敲除(D1^{-/-})小鼠和 D3 受体敲除(D3^{-/-})小鼠^[8,11],并在这两系基因敲除小鼠基础上,繁育出多巴胺 D1 和 D3 受体双基因敲除(D1^{-/-}D3^{-/-})小鼠。通过饲养繁育敲除小鼠,探讨 D1^{-/-}小鼠、D3^{-/-}小鼠及 D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠与野生型在进食、饮水、体重增长等方面的差异,为利用基因敲除小鼠研究多巴胺 D1、D3 受体的功能及它们之间的相互作用提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

引进及培育的 D1^{-/-}小鼠、D3^{-/-}小鼠、D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠和野生型(WT)小鼠饲养于西安交通大学医学部实验动物中心按照无特异病原(specific pathogen free, SPF)级标准饲养。室内温度控制在 18℃~22℃,湿度 50%~60%。实验动物生产合格证号为:SCXK(陕)2012-003;实验动物使用合格证号为:SYXK(陕)2012-005

1.2 不同基因型小鼠进食、饮水、体重变化的比较

1.2.1 不同基因型小鼠进食、饮水情况比较:选取 D1^{-/-}、D3^{-/-}、D1^{-/-}D3^{-/-}与 WT 四种基因型雄鼠各 7 只,对其 30 d、50 d、70 d 小鼠早晨 10 点通过电子天平称量前后 2d 的食物量及饮水量差别,对 24 h

内的进食量和饮水量进行测量,数据精确到 0.01 g。

1.2.2 不同基因型小鼠体重比较:对以上选取的 D1^{-/-}、D3^{-/-}、D1^{-/-}D3^{-/-}与 WT 四种基因型雄鼠早晨 10 点对 21 d(断乳时)、35 d、60 d、90 d 的小鼠通过电子天平称量前后体重差别,进行比较,数据精确到 0.01 g。

1.2.3 统计分析:分析各基因型小鼠间的统计学差异和各时间点敲除鼠与对照组的差别,采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),通过 Student-Newman-Keuls 检验,进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 不同日龄 D1^{-/-}、D3^{-/-}、D1^{-/-}D3^{-/-}与 WT 小鼠进食量比较

如图 1 所示,不同基因型小鼠进食量统计分析发现:30 d 时 D1^{-/-}小鼠、D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠、D3^{-/-}小鼠均比 WT 小鼠进食量低,且 D1^{-/-}小鼠、D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠较 WT 小鼠差异有显著性(D1^{-/-} vs. WT: * * $P < 0.001$; D1^{-/-}D3^{-/-} vs. WT: ^{##} $P < 0.001$), D3^{-/-}小鼠和 WT 小鼠相比进食量无统计学差异;50 d 所有基因型进食量均无统计学差异;70 d 时 D3^{-/-}小鼠进食量显著高于 WT 小鼠(D3^{-/-} vs. WT: ^{&&} $P < 0.001$),其他组间差异无显著性。

在 30 d 和 50 d 之间 D1^{-/-}小鼠进食量呈明显上升趋势,且 D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠进食量介于 D1^{-/-}小鼠和 D3^{-/-}小鼠之间;在 50 d 和 70 d 之间 D3^{-/-}小鼠进食量有一个显著上升趋势;WT 小鼠在此阶段进食量呈下降趋势。

2.2 不同日龄 D1^{-/-}、D3^{-/-}、D1^{-/-}D3^{-/-}与 WT 小鼠饮水量比较

如图 2 所示,不同基因型小鼠饮水量统计分析发现:与 WT 小鼠相比, D1^{-/-}小鼠和 D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠在 30 d(D1^{-/-} vs. WT: * * $P < 0.001$; D1^{-/-}D3^{-/-} vs. WT: ^{##} $P < 0.001$), 50 d(D1^{-/-} vs. WT: * * $P < 0.001$; D1^{-/-}D3^{-/-} vs. WT: ^{##} $P < 0.01$)以及 70 d(D1^{-/-} vs. WT: * * $P < 0.01$; D1^{-/-}D3^{-/-} vs. WT: ^{##} $P < 0.001$)饮水量均显著性较低,30 d 至 50 d 逐渐增长,50 d 饮水量达到最高,之后下降;D3^{-/-}小鼠在 30 d 至 50 d 之间饮水量与 WT 小鼠一样呈

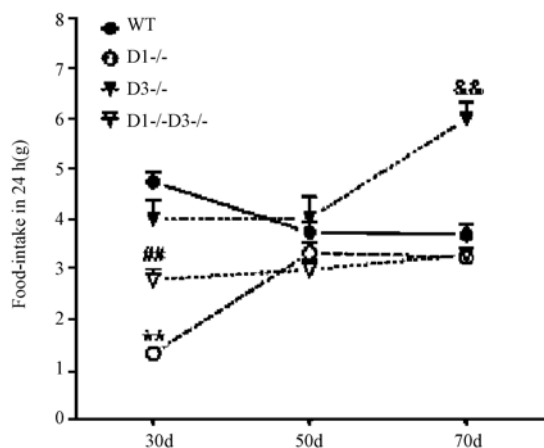


图 1 各基因型小鼠在不同日龄 24 h 进食。

Fig. 1 Comparison of the 24 h food intake between different genotype groups of mice at different time points.

下降趋势,与 WT 小鼠不同的是,50 d 至 70 d 之间 WT 小鼠饮水量依旧呈下降趋势,而 D3^{-/-} 小鼠呈上升趋势,且在 70 d 明显高于 WT 小鼠(D3^{-/-} vs WT: $^{&&}P < 0.001$)。

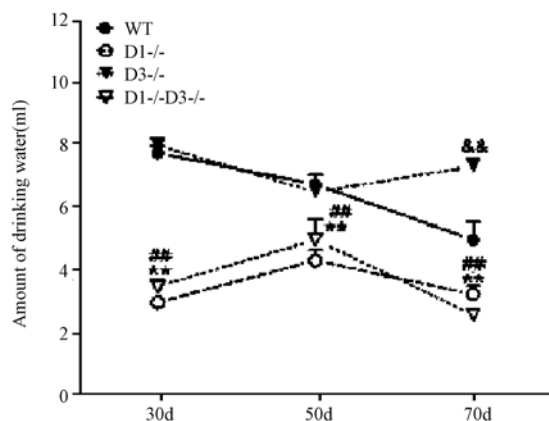


图 2 各基因型小鼠在不同日龄 24 h 饮水量。

Fig. 2 Comparison of the 24 h water intake between different genotype groups of mice at different time points.

2.3 D1^{-/-}、D3^{-/-}、D1^{-/-}D3^{-/-} 与 WT 小鼠不同日龄阶段体重增长比较

如图 3 所示,不同基因型小鼠体重增长统计分析发现:四种基因型小鼠在 90 d 前体重曲线均呈现上升趋势。21 d,三种基因缺陷小鼠与 WT 小鼠相比体重较小,且均有显著性差异(D1^{-/-} vs. WT: $^{*}P < 0.001$; D3^{-/-} vs. WT: $^{&&}P < 0.01$; D1^{-/-}D3^{-/-} vs. WT: $^{##}P < 0.001$);21 d 至 35 d, D3^{-/-} 小鼠和 D1^{-/-}D3^{-/-} 小鼠体重急剧上升;D3^{-/-} 小鼠除 21 d 外,其它时间点均与 WT 体重无差别;D1^{-/-}D3^{-/-} 小鼠在 60 d 以后与 WT 小鼠体重无统计学差

异;而 D1^{-/-} 小鼠直至 90 d 体重才与 WT 小鼠无统计学差异;90 d 时,各基因型小鼠体重间无统计学差异。

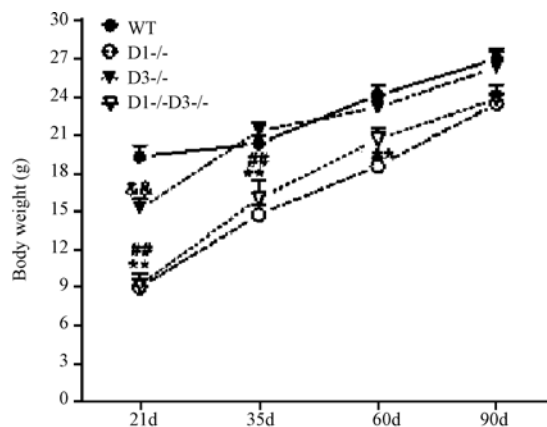


图 3 各基因型小鼠在不同日龄体重变化情况。

Fig. 3 Comparison of the body weight between different genotype groups of mice at different time points.

3 讨论

人类几乎所有的疾病都与基因有关,基因敲除动物模型的建立,为研究人类疾病提供了一个崭新方法,尤其是遗传性疾病^[12]。应用小鼠来复制动物模型是最经济最理想的^[13],本研究引进并繁育 D1^{-/-}和 D3^{-/-}小鼠后,培育出 D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠,完全按照 SPF 级动物饲养标准进行,为研究多巴胺受体介导的神经及生理活动制作本动物模型。同以往研究结果相同,繁育的小鼠后代基因型分布基本符合孟德尔定律^[8, 11]。

大量研究发现,下丘脑在摄食行为、内分泌调节和生理特性改变方面起到了关键的调节作用^[14],多巴胺通路会对食物适口性、食物相关性信号刺激、瘦素、生长激素释放肽及其它影响该系统活性的食欲相关调节因子产生应答^[15-18]。提示大脑多巴胺系统在食物的摄取过程中发挥重要作用^[19-21]。通过与受体相结合,多巴胺发挥生物学作用。本研究发现,各类型缺陷小鼠断乳体重均显著低于 WT 小鼠,而后呈上升趋势,35 d 时 D3^{-/-}与 WT 小鼠体重无统计学差异;D1^{-/-}D3^{-/-}小鼠体重在 60 d 时与 WT 小鼠趋于一致,而 D1^{-/-}小鼠体重直到 90 d 时与 WT 小鼠趋于一致。该实验结果提示:多巴胺通过 D1、D3 受体发挥相关作用,对小鼠断乳和 35 d 体重增长有一个较为显著的影响,可能由于哺乳期多巴胺 D1、D3 受体直接或间接地对母鼠的泌乳产

生影响,导致仔鼠断乳体重较小,断乳后进食量显著上升,体重随之呈代偿性增加^[7]。

本研究中,D1、D3 受体基因敲除后,通过影响多巴胺的生物学效应,进而影响仔鼠断乳体重。近年来,文献报道母犬舔舐子犬或饲喂子犬时,纹状核多巴胺大量释放;个体纹状核多巴胺的释放水平与母犬舔舐和饲喂行为显著相关^[22, 23]。同时研究报道,纹状核损伤或注射多巴胺受体拮抗剂可影响泌乳等母性行为^[24, 25]。因此,本文中,多巴胺 D1、D3 受体敲除对小鼠体重的影响可能有两方面因素,一是受体敲除后,通过多巴胺而调节下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴的活性,从而调控仔鼠的觅食与饱腹感,最终影响仔鼠初生重及泌乳期体重。二是多巴胺 D1、D3 受体基因的敲除可能通过干扰多巴胺活性调控泌乳等母性行为,进而影响小鼠的体重。多巴胺 D1、D3 受体如何影响小鼠泌乳导致体重增长变化的具体分子生物学机制,有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? [J]. Trends Neurosci, 2007, 30:375-381.
- [2] Pijl H. Reduced dopaminergic tone in hypothalamic neural circuits: expression of a "thrifty" genotype underlying the metabolic syndrome [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 480:125-131.
- [3] Lindvall O, Bjorklund A, Skagerberg G. Dopamine-containing neurons in the spinal cord: anatomy and some functional aspects [J]. Ann Neurol, 1983, 14 (3):255-260.
- [4] Dahlstroem A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons [J]. Acta Physiol Scand Suppl, 1964, 232 (Suppl): 231-255.
- [5] Fallon JH, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex [J]. J Comp Neurol, 1978, 180 (3):533-544.
- [6] Graybiel AM. Compartmental organization of the mammalian striatum [J]. Prog Brain Res, 1983, 58:247-256.
- [7] Fuxe K, Hokfelt T, Nilsson O. Factors involved in the control of the activity of the tubero-infundibular dopamine neurons during pregnancy and lactation [J]. Neuroendocrinology, 1969, 5(5): 257-270.
- [8] Xu M, Moratalla R, Gold LH, et al. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses [J]. Cell, 1994, 79 (4):729-742.
- [9] Xu M, Hu XT, Cooper DC, et al. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice [J]. Cell, 1994, 79 (6):945-955.
- [10] Rohrer DK, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression [J]. Physiol Rev, 1998, 78(1):35-52.
- [11] Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, et al. Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors [J]. Neuron, 1997, 19 (4):837-848.
- [12] 卢丽, 陈系古, 黄冰. 基因敲除动物的研究和应用 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 02:152-156.
- [13] 李晓娟, 白云峰, 崔智, 高蓉, 鲍龙涛, 李瑞生. 常用实验动物肝癌模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 04:73-77.
- [14] 马晓红, 苏卫. 肥胖研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 13(3):174-178.
- [15] Berthoud HR. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? [J]. Curr Opin Neurobiol, 2011, 21(6):888-896.
- [16] Berthoud HR. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment [J]. Proc Nutr Soc, 2012, 71(4):478-487.
- [17] Rui LY. Brain regulation of energy balance and body weight [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2013, 14:387-407.
- [18] Delaere F, Magnan C, Mithieux G. Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity [J]. Diabetes Metab, 2010, 36(4):257-262.
- [19] Wise RA. The parsing of food reward [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291:1234-1235.
- [20] Wise RA. Role of brain dopamine in food reward and reinforcement [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1471):1149-1158.
- [21] Sam AH, Troke RC, Tan TM, et al. The role of the gut/brain axis in modulating food intake [J]. Neuropharmacology, 2012, 63(1):46-56.
- [22] Champagne F, Chretien P, Stevenson CW, et al. Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat [J]. J Neurosci, 2004, 24:4113-4123.
- [23] Mileva-Seitz V, Fleming AS, Meaney MJ, et al. Dopamine receptors D1 and D2 are related to observed maternal behavior [J]. Genes Brain Behav, 2012, 11(6):684-694.
- [24] Numan M, Numan MJ, Pliakou N, et al. The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats [J]. Behav Neurosci, 2005, 119:1588-1604.
- [25] Parada M, King S, Li M et al. The roles of accumbal dopamine D1 and D2 receptors in maternal memory in rats [J]. Behav Neurosci, 2008, 122:368-376.

[修回日期]2014-08-02