

恐伤孕鼠所产 80 日龄仔鼠认知发育与 海马区多巴胺、二羟苯乙酸的相关性

李新民, 杨丽萍*, 万海娇, 朱江慧, 侯俊林, 詹向红

(河南中医药大学中西医结合基础学科, 郑州 450046)

【摘要】 目的 考察恐伤孕鼠所产 80 日龄仔鼠认知发育与海马区多巴胺(dopamine, DA)、二羟苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)含量的影响,并探讨二者的相关性。**方法** 应用旁观电击法建立恐伤孕鼠模型,通过对 80 日龄仔鼠进行 Morris 水迷宫实验,观察其认知发育;通过脑立体定位仪在右侧海马区采集脑透析液,应用高效液相色谱-电子俘获检测(HPLC-ECD)法测定仔鼠脑透析液中 DA、DOPAC 含量。**结果** 与对照组比较,80 日龄模型组仔鼠平均逃避潜伏期时间增加、游泳速度减慢、20% 边缘区域停留时间增长、跨台次数减少,差异有显著性($P < 0.05$);80 日龄模型组仔鼠海马组织细胞外液中 DA、DOPAC 的水平在各个灌流时间点均降低,差异有显著性($P < 0.05$);80 日龄仔鼠海马区单胺类神经递质 DA 与其平均逃避潜伏期、跨台次数存在正相关,与 20% 边缘区域停留时间存在负相关关系,相关性显著($P < 0.05$);DOPAC 与其平均逃避潜伏期、跨台次数存在正相关,相关性显著($P < 0.05$)。**结论** 恐伤孕鼠可影响其 80 日龄仔鼠空间学习记忆能力,减少海马区 DA、DOPAC 含量,其认知发育水平与海马区 DA、DOPAC 的含量降低密切相关。

【关键词】 恐伤孕鼠;认知发育;海马区;多巴胺;二羟苯乙酸;相关性研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 11-0010-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.11.003

Correlation between cognitive development and levels of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the hippocampus in 80-day-old neonatal rats born of fear-impaired pregnant rats

LI Xin-min, YANG Li-ping*, WAN Hai-jiao, ZHU Jiang-hui, HOU Jun-lin, ZHAN Xiang-hong

(Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between cognitive development and levels of dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the hippocampus of 80-day-old neonatal rats born of fear-impaired pregnant rats. **Methods** The pregnant rat model of fear-impaired kidney was established by watching other rats shocked with electricity. The cognitive development of the neonatal rats was assessed by Morris water maze test at 80 days after birth. The brain microdialysis samples of the right hippocampus were collected using a stereotaxic instrument, and the levels of DA and DOPAC were determined by HPLC-ECD. **Results** Compared with the control group, the mean escape latency of the 80-day-old neonatal rats in the model group was increased. Their swimming speed was slower. The 20% time spent in the peripheral zone became longer, and the frequency of platform crossing was decreased, showing significant

【基金项目】 国家自然科学基金医学科学部面上项目(编号:81373790)。

【作者简介】 李新民(1982 -),男,博士,讲师,研究方向:中西医结合基础。E-mail: xinmin081682@126.com

【通讯作者】 杨丽萍(1966 -),女,博士,教授,研究方向:孕期心理应激与子代情志和认知发育关系。E-mail: bioylp@126.com

differences ($P < 0.05$). The levels of DA and DOPAC in the extracellular fluid of the hippocampus of the 80-day-old neonatal rats in the model group were decreased at each time points of perfusion, showing a significant difference ($P < 0.05$). The level of DA, a kind of monoamine neurotransmitter in the hippocampus, was positively correlated with the mean escape latency, the frequency of passing the platform of the 80-day-old rats, while was negatively correlated with the 20% time spent in the peripheral zone, with a significant correlation ($P < 0.05$). In addition, there was a positive correlation between the DOPAC level and the mean escape latency, the frequency of passing the platform ($P < 0.05$).

Conclusions Fear-impaired pregnant rats can affect the spatial learning and memory ability of their 80-day-old neonatal rats, with reduction in the levels of DA and DOPAC in the hippocampus, which is closely correlated with the cognitive development of the neonatal rats.

[Key words] Fear-impaired pregnant rats; Cognitive development; Hippocampus; Dopamine, DA; 3, 4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; Correlation study

地震、战争等自然灾害和人为灾害的发生,使恐惧情绪长期持续存在^[1]。中医情志学说认为“肾藏志,在志为恐”,而肾所藏之“志”的主要含义亦包括记忆,说明“恐”和记忆有内在的联系^[2]。长期的恐惧刺激势必会对记忆产生不良影响,这一影响同其他慢性应激一样会传递给子代,影响子代的学习记忆能力^[3,4]。本课题通过旁观电击法建立恐惧模型,观察孕期恐惧刺激对子代空间探索和学习记忆的影响,并研究其与海马区多巴胺(dopamine, DA)及其代谢产物二羟苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)的相关性,以揭示子代认知能力改变的物质基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

80 日龄 SPF 级 Wistar 大鼠 59 只,其中,雌鼠 34 只,体重 220 ~ 250 g;雄鼠 25 只,体重 250 ~ 290 g。采用 Morris 水迷宫实验评价其认知水平,选取基线水平一致的雌鼠按照随机数字表法将实验大鼠分为模型组和对照组,每组 15 只。选取基线水平一致且体格较强壮的 15 只雄鼠作为交配鼠,剩余的均作电击鼠用。以上 SPF 级 Wistar 大鼠均由山东鲁抗公司提供[SCXK(鲁)2014-0001]。雌鼠分组:按照随机数字表法将实验大鼠分为模型组和对照组,每组 15 只动物,多余的雌鼠备用,运用旁观电击法建立孕期恐伤肾大鼠动物模型^[2]。微透析检测探针放置在河南中医药大学实验动物中心动物实验设施内进行[SYXK(豫)2014-2312]。实验获得河南中医药大学实验动物伦理委员会的批准(20130016),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 实验方法

1.2.1 恐伤肾孕鼠模型的建立

自制交流箱是参照 Ogawa 和 Kuwabara^[5] 的 Communication Box System 改进而成,由 45 cm × 45 cm × 30 cm 有机玻璃组成,室内采用有机玻璃板分为 9 个 15 cm × 15 cm × 30 cm 小室,小室之间有机玻璃板上有若干直径为 1 cm 小孔,既可供旁观鼠逃避电击攀爬,又可使旁观鼠通过视觉、听觉、嗅觉获得临近大鼠的恐惧信息。底部由直径 3 mm、间隔 11 mm 的不锈钢丝组成,可以连接调压器给予大鼠足底电击。放置电击鼠的中央小室及四角小室 15 cm 高处加隔板进行束缚,使其不能逃避足底电击,而放置旁观鼠的其余四个小室不加隔板。

模型制备的方法:自造模第 1 天起于 9:00 a. m. 将电击鼠和旁观鼠放入自制交流箱相应的小室内,电击 10 次/d,3 min/次。具体如下:秒表定时 165 s,定时结束后鸣响 15 s,鸣响时段给予瞬时 25 ~ 35 V 电刺激 6 ~ 8 次,重复 10 次/d,旁观鼠可以通过攀爬逃避电击,电击鼠却因受到上部隔板的束缚遭受电击表现为尖叫、跳跃、二便失禁,从而使旁观鼠通过听觉、视觉、嗅觉产生恐惧的心理反应。

1.2.2 雌鼠孕检方法

各组雌鼠从第 15 天起于 9:00 p. m. 按雌雄 2:1 合笼,次日 7:00 a. m. 检查受孕情况。如发现雌鼠阴道口内有乳白色的阴栓,即可判定为受孕,记为孕第 1 天。如未发现阴栓可采用阴道涂片法进行进一步检测。步骤如下:(1)阴道涂片:取待测雌鼠,一手将雌鼠固定并露出阴道口,另一手用沾有生理盐水的棉签轻轻地伸入雌鼠阴道 1 ~ 2 cm,并缓慢转动大半圈,抽出棉签,迅速将棉签上黏附物均匀平涂在载玻片上;(2)镜检:显微镜下观察涂片,如发现长钩状的精子,即可判定为受孕,记为孕第 1 天。而未受孕的雌鼠继续连续合笼 12 d,如仍未受孕者则为不孕鼠。

仔鼠延续母鼠分组,按随机数字表法从出生的仔鼠中每窝抽取 5 只继续饲养,至 80 d 时再按随机数字表法分别抽取 15 只进行 Morris 水迷宫实验,并用微透析技术采集脑透析液检测 DA、DOPAC。

1.2.3 80 日龄仔鼠学习记忆能力的测定 (Morris 水迷宫实验)

选择直径为 2 m 的水池。空间定位航行实验过程中应确保平台位置保持不变,水温控制在 25 ~ 27℃,水位高于平台约 1 cm,水中加入高锰酸钾搅拌均匀,以确保仔鼠在水池中游泳时看不到平台,空间定位航行实验连续进行 3 d,第 4 天进行空间探索实验。

空间定位航行实验,历时 3 d,每天测试 4 次,每 2 次实验间隔为 40 min,每次实验时随机选取仔鼠的入水点,将其面向池壁放入水中,检测 2 min,仔鼠在平台上停留超过 5 s 即为寻台成功,若超过 2 min 依旧未找到平台则需将动物引至平台处,并使其在平台上停留 30 s,将仔鼠从入水到寻台成功的时间记为逃避潜伏期,寻台未成功的记潜伏期为 120 s。第 4 天开始进行空间搜索实验,撤去平台,按照随机数字表法选择仔鼠 4 个象限的入水点,记录仔鼠在 2 min 内的跨越平台次数、游泳速度、20% 边缘区域停留时间。

1.2.4 80 日龄仔鼠海马区 DA、DOPAC 检测

(1)脑透析液采样:麻醉仔鼠,头部剃除毛发后,将其固定在脑立体定位仪上,定位仔鼠右侧海马区,选取的坐标分别为:A: - 2.8 mm,L: + 3 mm,V:3.4 mm;A: - 5.20 mm,L: + 5 mm,V:6.5 mm,植入套管、探针,微量注射泵设定流速为 1.5 μL/min,采集的透析液收集到自动采样器的一次性 EP 管内,自动采样器温度设置为 4℃,每 20 min 收集一

管,收集完毕直接用高效液相色谱-电子俘获检测 (HPLC-ECD)法进行检测,未能及时检测的放入 - 80℃冰箱内保存。

(2)标准品的配制:精密称取 DA、DOPAC 各 0.5 mg,置于 10 mL 定量瓶中,用林格氏液定容至 10 mL 制成母液,将母液分别稀释并混合,最后制成浓度为 100 ng/mL,50 ng/mL,25 ng/mL,12.5 ng/mL,6.25 ng/mL 的梯度混合对照品溶液,置于 - 80℃冰箱保存。

(3)HPLC-ECD 法测定仔鼠脑透析液中 DA、DOPAC 含量:色谱条件:流动相 A 为磷酸二氢钠 100 mmol/L,柠檬酸钠 50 mmol/L,EDTA 50 μmol/L,辛烷磺酸钠 1.7 mmol/L,氯化钾 2 mmol/L;流动相 B 为乙腈。A: B = 90: 10。设定流动相流速为 0.125 mL/min,柱温 30℃,电化学检测器应用玻碳工作电极,工作电压为 520 mV,增益为 10 nA,进样量为 20 μL。

1.3 统计学方法

服从正态分布且满足方差齐性检验的数据,采用独立样本 *t* 检验。对于不满足 *t* 检验条件的采用非参数秩和检验。采用 Pearson 积差分析法进行相关性分析,检验水准均取 *P* = 0.05, *P* < 0.05 表明具有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验结果

80 日龄模型组仔鼠较对照组同日仔鼠平均逃避潜伏期时间久、游泳速度慢、跨台次数少、20% 边缘区域停留时间长,差异有显著性 (*P* < 0.05)。见表 1、2。

表 1 80 日龄仔鼠空间定位航行实验中平均逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 15, *s*)

Tab. 1 Mean escape latency of the 80-day-old neonatal rats in the spatial navigation test

组别 Groups	第 1 天 1st day	第 2 天 2nd day	第 3 天 3rd day
对照组 Control group	51.23 ± 13.18	37.00 ± 10.27	24.75 ± 6.96
模型组 Model group	74.03 ± 9.60 *	54.87 ± 10.00 *	41.15 ± 9.46 *

注:采用独立样本 *t* 检验,与对照组比较, * *P* < 0.05。
Note. Independent sample *t* test was used, and compared with the control group, * *P* < 0.05.

表 2 80 日龄仔鼠空间探索实验中各个指标的比较 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 15)

Tab. 2 Comparison of the indicators of 80-day-old neonatal rats in the space exploration test

组别 Groups	游泳速度/m/s Swimming speed	20% 边缘区域停留时间/s 20% time spent in the peripheral zone	跨越平台次数 Frequency of crossing the platform
对照组 Control group	27.48 ± 6.05	30.49 ± 8.04	4.27 ± 1.33
模型组 Model group	15.45 ± 2.47 *	40.90 ± 5.78 *	2.06 ± 1.03 *

注:采用独立样本 *t* 检验,与对照组比较, * *P* < 0.05。
Note. Independent sample *t* test was used, and compared with the control group, * *P* < 0.05.

表 3 80 日龄仔鼠海马组织中 DA 的水平($\bar{x} \pm s, n = 15, \text{ng/mL}$)
Tab.3 Dopamine levels in the hippocampus of 80-day-old neonatal rats

组别 Groups	灌流时间/min Time points of perfusion					
	80	100	120	140	160	180
对照组 Control group	19. 89 $\pm$ 1. 28	19. 84 $\pm$ 1. 20	19. 03 $\pm$ 2. 10	19. 85 $\pm$ 1. 02	19. 87 $\pm$ 1. 17	18. 96 $\pm$ 1. 52
模型组 Model group	3. 44 $\pm$ 0. 68 *	3. 59 $\pm$ 0. 91 *	3. 62 $\pm$ 0. 79 *	3. 70 $\pm$ 0. 76 *	3. 71 $\pm$ 0. 82 *	3. 80 $\pm$ 0. 85 *

注:采用独立样本 t 检验,与对照组比较, * $P < 0.05$ 。
Note. Independent sample t test was used, and compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 4 80 日龄仔鼠海马组织中 DOPAC 的水平($\bar{x} \pm s, n = 15, \text{ng/mL}$)
Tab.4 DOPAC levels in the hippocampus of 80-day-old neonatal rats

组别 Groups	灌流时间/min Time points of perfusion					
	80	100	120	140	160	180
对照组 Control group	9. 96 $\pm$ 3. 85	10. 47 $\pm$ 4. 28	10. 88 $\pm$ 1. 70	10. 15 $\pm$ 4. 80	9. 97 $\pm$ 4. 03	8. 80 $\pm$ 4. 35
模型组 Model group	5. 09 $\pm$ 3. 35 *	4. 99 $\pm$ 3. 25 *	5. 08 $\pm$ 3. 23 *	4. 86 $\pm$ 3. 27 *	4. 96 $\pm$ 3. 09 *	4. 70 $\pm$ 3. 22 *

注:采用独立样本 t 检验,与对照组比较, * $P < 0.05$ 。
Note. Independent sample t test was used, and compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 5 仔鼠情志和认知发育与海马区单胺类神经递质相关性分析(r 值)
Tab.5 Correlation between emotional and cognitive development and levels of monoamine neurotransmitter in the hippocampus of neonatal rats (r value)

检测指标 Indicators tested	DA	DOPAC
平均逃避潜伏期 Mean escape latency	0. 487 *	0. 419 *
跨台次数 Frequency of crossing the platform	0. 630 *	0. 460 *
20% 边缘区域停留时间 20% time spent in the peripheral zone	-0. 643 *	-0. 253

注: * $P < 0.05$ 。
Note. * $P < 0.05$.

2.2 80 日龄仔鼠海马组织细胞外液中 DA 的水平

80 日龄模型组仔鼠海马组织细胞外液中 DA 的水平各个灌流时间点均较同日龄对照组仔鼠低, 差异有显著性($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 80 日龄仔鼠海马组织细胞外液中 DOPAC 的水平

80 日龄模型组仔鼠海马组织细胞外液中 DOPAC 的水平各个灌流时间点均较对照组同日龄仔鼠低, 差异有显著性($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 80 日龄仔鼠认知发育与海马区单胺类神经递质相关性分析

80 日龄仔鼠海马区单胺类神经递质 DA 与其平均逃避潜伏期、跨台次数存在正相关, 与 20% 边缘区域停留时间存在负相关关系, 相关性显著($P < 0.05$); DOPAC 与其平均逃避潜伏期、跨台次数存在正相关, 相关性显著($P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

海马区是与学习记忆功能,尤其是空间学习和记忆能力关系最为密切的部位。行为学实验表明多巴胺或多巴胺激动剂能增强记忆^[6],并且情景记忆在变成持久记忆的过程中,多巴胺是必需的神经递质,而在衰老时的突出表现是多巴胺神经元缺失和情节记忆下降^[7]。背侧海马区的多巴胺,无论从空间学习记忆、突触可塑性到精神疾病潜在的缺陷,都发挥重要的作用;背侧海马缺乏腹侧被盖区多巴胺能轴突,而多巴胺受体网络密集,背侧海马多巴胺能轴突以及释放的多巴胺主要来自于蓝斑神经元^[8]。在空间学习记忆能力的形成过程中,多巴胺受体 D1R 和 D5R 起到独一无二的作用^[9]。故本研究在考察恐伤孕鼠对子代空间学习记忆能力的影响时,选择应用微透析技术检测海马区 DA 及其代谢产物 DOPAC 的水平。

Morris 水迷宫作为行为和认知神经科学最常用工具,能反映实验动物空间学习和记忆能力,是进行学习记忆功能研究的可靠方法^[10, 11]。研究结果表明:恐伤孕鼠所产 80 日龄仔鼠平均潜伏期延长,说明其空间学习和记忆能力降低;空间探索实验中,恐伤孕鼠所产 80 日龄仔鼠游泳速度变慢、20% 边缘区域百分比变大,跨越平台次数减少,表明恐伤孕鼠对仔鼠心理应激有远期影响效应。海马 DA 和 DOPAC 水平与其平均逃避潜伏期、跨台次数存在正相关,且 DA 与 20% 边缘区域停留时间存在负相关关系,说明恐伤孕鼠对仔鼠学习记忆能力的远期影响,与 DA 和 DOPAC 水平的降低密切相关。

临床研究表明,产前 DA 水平与抑郁分数呈负相关,与新生儿 DA 和行为调节呈正相关^[12];动物实验结果则显示产前应激引起多巴胺释放减少^[13];而学习记忆能力的缺陷与海马区解剖结构异常密切相关^[14, 15],这些研究均能印证本研究结果的可靠性,也为进一步深入研究指明方向。同时,胆碱能递质也是公认的调控学习记忆的神经递质,课题未来也会对其进行探索研究。

参考文献:

- [1] Liu X, Ma X, Hu X, et al. A risk score for predicting post-traumatic stress disorder in adults in a Chinese earthquake area [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(6): 2191–2198.
- [2] 刘书考,严灿,吴丽丽,等. “肾藏志应恐”有关神经生物学机制的研究思路 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(2): 106–110.
- [3] Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002, 26(4): 457–470.
- [4] 杨丽萍,袁福宁,李新民,等. 恐伤母鼠对仔鼠空间学习及记忆能力影响 [J]. *中国公共卫生*, 2013, 29(2): 214–216.
- [5] 冯新玲,周安方,周慧芳,等. 恐伤孕鼠对其仔鼠脑发育的

影响及其机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(9): 2063–2065.

- [6] Wise RA. Dopamine, learning and motivation [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(6): 483–494.
- [7] Lewis S. Dopamine boosts ageing memories [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13(12): 812.
- [8] Kempadoo KA, Mosharov EV, Choi SJ, et al. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(51): 14835–14840.
- [9] Sariñana J, Tonegawa S. Differentiation of forebrain and hippocampal dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in spatial learning and memory [J]. *Hippocampus*, 2016, 26(1): 76–86.
- [10] Weitzner DS, Engler-Chiurazzi EB, Kotilinek LA, et al. Morris water maze test: optimization for mouse strain and testing environment [J]. *J Vis Exp*, 2015(100): e52706.
- [11] Wang W, Liu L, Jiang P, et al. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 636: 233–240.
- [12] Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, et al. Prenatal dopamine and neonatal behavior and biochemistry [J]. *Infant Behav Dev*, 2008, 31(4): 590–593.
- [13] Pallarés ME, Antonelli MC. Hormonal modulation of catecholaminergic neurotransmission in a prenatal stress model [J]. *Adv Neurobiol*, 2015, 10: 45–59.
- [14] Hosseini-Sharifabad M, Hadinedoushan H. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus [J]. *Anat Sci Int*, 2007, 82(4): 211–217.
- [15] Brown PL, Shepard PD, Elmer GI, et al. Altered spatial learning, cortical plasticity and hippocampal anatomy in a neurodevelopmental model of schizophrenia-related endophenotypes [J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 36(6): 2773–2781.

[收稿日期]2017–01–10