

三碘甲状腺原氨酸对兴奋毒性脑损伤模型小鼠学习记忆行为的影响

伍根峰 贺湘英 李琪 徐静 肖群文 齐志业 梁琨

(昆明医学院第一附属医院儿科,云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 有研究表明甲状腺功能减退大鼠学习、记忆功能的损伤与神经元局部三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T_3)缺乏有关。该研究探讨左旋三碘甲状腺原氨酸($L-T_3$)对新生小鼠兴奋毒性脑损伤后学习、记忆行为的影响。**方法** 5日龄ICR种小鼠71只,用鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IA)建立兴奋毒性脑损伤模型,随机分为磷酸盐缓冲液(PBS)组($n=14$,脑内及腹腔注射PBS 10 mL/kg)、IA组($n=14$,脑内注射IA+腹腔注射PBS 10 mL/kg)、低剂量 T_3 组($n=14$,脑内注射IA+腹腔注射 $L-T_3$ 0.2 $\mu\text{g/kg}$)、中剂量 T_3 组($n=15$,脑内注射IA+腹腔注射 $L-T_3$ 0.5 $\mu\text{g/kg}$)、高剂量 T_3 组($n=14$,脑内注射IA+腹腔注射 $L-T_3$ 1 $\mu\text{g/kg}$)。腹腔注射时间为小鼠脑内注射后1、24、48、72、96 h。小鼠于生后第33、34天进行Y-迷宫分辨学习实验。**结果** PBS组、IA组、低、中、高剂量 $L-T_3$ 组小鼠学会所需次数分别为 15.0 ± 4.7 、 21.3 ± 6.3 、 20.5 ± 6.0 、 21.0 ± 6.5 、 15.8 ± 4.5 ,高剂量 $L-T_3$ 组小鼠“学会”所需次数明显低于IA组和中、低剂量 $L-T_3$ 组($P<0.05$);记忆正确率分别为 $(90.7 \pm 7.3)\%$ 、 $(79.3 \pm 10.0)\%$ 、 $(77.9 \pm 14.2)\%$ 、 $(80.7 \pm 12.2)\%$ 、 $(91.4 \pm 9.5)\%$,高剂量 $L-T_3$ 组小鼠记忆正确率明显高于IA组和中、低剂量 $L-T_3$ 组($P<0.05$)。**结论** 高剂量 $L-T_3$ (1 $\mu\text{g/kg}$)能促进兴奋毒性脑损伤小鼠的学习记忆行为。

[中国当代儿科杂志,2010,12(4):284-286]

[关键词] 三碘甲状腺原氨酸;鹅膏蕈氨酸;兴奋毒性;脑损伤;新生小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)04-0284-03

Effects of triiodothyronine on the learning and memory behaviors in neonatal mice following excitotoxic brain damage

WU Gen-Feng, HE Xiang-Ying, LI Qi, XU Jing, XIAO Qun-Wen, QI Zhi-Ye, LIANG Kun. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China (Liang K, Email: kunliang_cn@126.com)

Abstract: Objective Some research has shown that learning and memory function impairments in rats with hypothyroidism are associated with triiodothyronine (T_3) deficiency in neurons. This study aimed to investigate the effects of $L-T_3$ administration on learning and memory behaviors in neonatal mice with excitotoxic brain damage. **Methods** Seventy-one 5-day-old ICR neonatal mice were randomly assigned to five groups: controls that received intracerebral and intraperitoneal injections of phosphate buffered saline (PBS) ($n=14$); a group that received intracerebral injections of ibotenic acid (IA) and intraperitoneal injection of PBS ($n=14$); 3 groups that received intracerebral injections of IA and intraperitoneal injection of $L-T_3$ at 0.2, 0.5, and 1 $\mu\text{g/kg}$, respectively ($n=14-15$). Intraperitoneal injections were done 1, 24, 48, 72 and 96 hrs after intracerebral injections. Learning and memory functions were evaluated by the Y-maze discrimination learning test on postnatal days 33-34. **Results** The learning and memory functions in the highest $L-T_3$ dose group were significantly better than those in the IA, and the lower $L-T_3$ dose groups, presenting with decreased number of trials to criterion [15.8 ± 4.5 vs 21.3 ± 6.3 (IA group), 20.5 ± 6.0 (0.2 $\mu\text{g/kg}$ $L-T_3$ group) or 21.0 ± 6.5 (0.5 $\mu\text{g/kg}$ $L-T_3$ group); $P<0.05$], and achieving a higher correct percentage [$91.4 \pm 9.5\%$ vs $79.3 \pm 10.0\%$ (IA group), $77.9 \pm 14.2\%$ (0.2 $\mu\text{g/kg}$ $L-T_3$ group) or $80.7 \pm 12.2\%$ (0.5 $\mu\text{g/kg}$ $L-T_3$ group); $P<0.05$]. **Conclusions** High-dose $L-T_3$ (1 $\mu\text{g/kg}$) may improve learning and memory functions in mice following excitotoxic brain damage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (4):284-286]

Key words: Triiodothyronine; Ibotenic acid; Excitotoxic; Brain damage; Neonatal mice

[收稿日期]2009-09-24;[修回日期]2009-12-26
[基金项目]云南省自然科学基金(2004C0019R)。
[作者简介]伍根峰,男,硕士,主治医师。
[通信作者]梁琨,教授。

随着早产儿存活率的逐年提高,早产儿脑损伤的发生率亦在逐年增加。早产儿脑损伤主要为脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL),临床上表现脑瘫、智能落后和学龄期认知功能障碍等后遗症^[1]。目前,早产儿PVL尚无特效治疗^[2]。本研究通过探讨三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T_3)对新生小鼠兴奋毒性脑损伤后学习记忆行为的影响,为早产儿脑白质损伤新的治疗方法的探索提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

由昆明医学院动物科提供5日龄ICR种小鼠71只,雌雄不限,体重 ≥ 3.0 g。神经兴奋毒素鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IA)及左旋三碘甲状腺原氨酸($L-T_3$)系美国Sigma公司生产; $L-T_3$ 应用0.01 mmol/L (pH 7.4)磷酸盐缓冲液(PBS)分别稀释为高剂量(1 $\mu\text{g/mL}$)、中剂量(0.5 $\mu\text{g/mL}$)、低剂量(0.2 $\mu\text{g/mL}$)浓度溶液。吸入麻醉药品异氟烷由美国波多黎各百特公司生产。

1.2 兴奋毒性脑损伤模型的建立

参照Marret等^[3]的方法,生后5日新生小鼠异氟烷吸入麻醉后,用5 μL 的微量注射器脑内注射IA,注射位置在右侧大脑半球额顶叶区头皮下2 mm,距矢状缝旁2 mm,矢状缝与人字缝交点3 mm。分两次注入,每次1 μL (5 μg IA)。每次注入后穿刺针留置20 s。PBS组以同样的方法脑内注射PBS缓冲液。

1.3 动物分组

71只小鼠采用完全随机的方法分为PBS组($n=14$,脑内及腹腔注射PBS 10 mL/kg)、IA组($n=14$,脑内注射IA+腹腔注射PBS 10 mL/kg)、低剂量 T_3 组($n=14$,脑内注射IA+腹腔注射 $L-T_3$ 0.2 $\mu\text{g/kg}$)、中剂量 T_3 组($n=15$,脑内注射IA+腹腔注射 $L-T_3$ 0.5 $\mu\text{g/kg}$)、高剂量 T_3 组($n=14$,脑内注射IA+腹腔注射 $L-T_3$ 1 $\mu\text{g/kg}$)。腹腔注射时间为小鼠脑内注射后1 h、24 h、48 h、72 h、96 h。

1.4 Y-迷宫分辨学习实验

在小鼠生后的第33、34天进行^[4]。实验装置为具有相等三分岔的Y型盒(18 cm $\times$ 8 cm $\times$ 15 cm),分别标为A、B、C臂,箱底由铜丝组成,间隔3 mm左右。A臂外1/2端铜丝不通电,为安全区。C臂近端为起步区。实验分2 d进行。第1天实验前,先将小鼠放入C臂而不通电,使小鼠自由活动熟悉

各臂环境。正式实验时,动物放于C臂起步区,电击小鼠足部(电击参数为40 V),小鼠即奔跑逃避,直至安全区。凡小鼠受电击后能从起步区直接逃至安全区为正确反应,否则属错误反应,每训练10次让小鼠休息1 min。以连续10次训练中有9次(90%)正确反应定为学会标准。记录“学会”所需训练次数。第2天记录10次训练中正确反应次数作为记忆保持率,以每组平均正确反应百分率作为评价记忆指标。正确反应率(%) = 正确反应数/总测试次数 $\times 100\%$ 。

1.5 统计方法

采用SPSS 11.0软件进行处理和分析,组间比较采用方差分析,两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

小鼠生后第33天PBS组、IA组和低、中、高剂量 $L-T_3$ Y-迷宫分辨试验“学会”所需次数分别为 15.0 ± 4.7 、 21.3 ± 6.3 、 20.5 ± 6.0 、 21.0 ± 6.5 、 15.8 ± 4.5 。IA组小鼠“学会”所需次数明显高于PBS组($q = 6.29$, $P < 0.01$);高剂量 $L-T_3$ 组小鼠“学会”所需次数明显低于IA组和低、中剂量 $L-T_3$ 组($F = 4.22$, $P < 0.05$),与PBS组小鼠“学会”所需次数差异无统计学意义($q = 0.79$, $P > 0.05$);中、低剂量 $L-T_3$ 组与IA组小鼠“学会”所需次数差异无统计学意义。

小鼠生后第34天PBS组、IA组和低、中、高剂量 $L-T_3$ 组Y-迷宫分辨试验记忆正确率分别为($90.7 \pm 7.3\%$)、($79.3 \pm 10.0\%$)、($77.9 \pm 14.2\%$)、($80.7 \pm 12.2\%$)、($91.4 \pm 9.5\%$)。IA组小鼠Y-迷宫分辨试验记忆正确率明显低于PBS组($q = 0.11$, $P < 0.05$);高剂量 $L-T_3$ 组记忆正确率明显高于IA组和低、中剂量 $L-T_3$ 组($F = 5.04$, $P < 0.05$),与PBS组小鼠记忆正确率无统计学意义($q = 0.01$, $P > 0.05$);中、低剂量 $L-T_3$ 组与IA组小鼠记忆正确率差异无统计学意义。

3 讨论

早产儿脑白质损伤的病因是多因素的,涉及到围生期前和围生期因素,其中过度释放的谷氨酸(glutamate, Glu)及其随之激活的兴奋毒性级联反应为这些危险因素提供了共同的分子通路^[5]。Glu通过过度激活N-甲基-D-天门冬氨酸型谷氨酸盐受

体,从而引起钙进入细胞内,钙致敏酶的激活,氧自由基的形成,最后引起线粒体的损伤等一系列级联反应,从而引起了胶质细胞的死亡或凋亡^[6]。针对新生儿脑白质损伤的研究,国内相继建立了感染性脑白质损伤的动物模型和缺血性脑损伤的动物模型,但对于兴奋毒性脑损伤的动物模型尚无报道。国外于1995年成功建立了新生小鼠兴奋毒性脑损伤模型,模拟早产儿脑室周围白质软化的病变,并对其发生机制和神经保护作用进行了研究^[3]。

甲状腺素(thyroxine, TH)的生物活性形式是T₃,它对脑发育中神经细胞分化、凋亡、神经元之间的网络形成、树突状结构和突触的发生及胶质细胞增殖髓鞘形成均起着重要的作用^[7]。研究表明,轻度甲状腺功能减退大鼠模型存在与海马轴突生长有密切关系的生长相关蛋白基因表达水平的改变,从而影响了海马突触的信息传递和可塑性,因此认为甲状腺功能减退大鼠学习、记忆功能的损伤与神经元局部T₃缺乏有关^[8]。本研究显示在Y-迷宫分辨学习实验中,IA组小鼠学会所需次数明显高于PBS组,记忆正确率明显低于PBS组,表明兴奋毒性脑损伤小鼠存在学习和记忆能力损伤。高剂量L-T₃组小鼠学会所需次数明显低于IA组,记忆正确率明显高于IA组,表明高剂量T₃可改善兴奋毒性脑损伤小鼠学习和记忆功能。国外的研究发现,给予小鼠腹腔注射T₃可减少兴奋毒性脑损伤细胞的凋亡^[9],提示有可能通过提高外周循环的T₃浓度来提高脑内的T₃水平^[10],进而促进神经元的发育、胶质细胞的增殖、分化和成熟,修复受损的髓鞘,从而影响海马突触的信息传递和可塑性,进而影响学习记忆功能。但其分子机制有待进一步研究。

本研究结果表明,高剂量L-T₃(1 μg/kg)能促

进兴奋毒性脑损伤小鼠学习记忆行为发育,从而为围生期脑损伤神经保护的临床研究提供理论依据。

[参 考 文 献]

[1] 毛健. 早产儿脑白质损伤的有关问题[J]. 中国实用儿科杂志, 2002, 17(7):386-389.

[2] 李晋辉. 早产儿脑室周围白质软化治疗进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 4(9):327-329.

[3] Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions[J]. Neuropathol Exp Neurol, 1995, 54(3):358-370.

[4] Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(7):587-590.

[5] Patkai J, Mesples B, Dommergues MA, Fromont G, Thornton EM, Renaud JC, et al. Deleterious effects of IL-9 activated mast cell and neuroprotection by antihistamine drugs in the developing mouse brain[J]. Pediatr Res, 2001, 50(2):222-230.

[6] Johnston MV, Frescher WH, Ishida A, Nakajima W. Novel treatments after experimental brain injury[J]. Semin Neonatal, 2000, 5(1):75-86.

[7] Bernal J. Thyroid hormones and brain development[J]. Vitam Horm, 2005, 71(4):95-122.

[8] Gerges NZ, Alzoubi KH, Park CR, Diamond DM, Alkadhi KA. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats[J]. Behav Brain Res, 2004, 155(1):77-84.

[9] Sürközy G, Griesmaier E, He X. T₃ replacement does not prevent excitotoxic cell death but reduces developmental neuronal apoptosis in newborn mice[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2007, 11(3):129-135.

[10] Palha JA, Nissanov J, Fernandes RJC. Sousa JC, Bertra L, Dratman MB, et al. Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin[J]. Neuroscience, 2002, 113(4):837-847.

(本文编辑:黄 榕)