

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.10.018

论著 · 实验研究

多巴胺受体调节对新生大鼠缺氧缺血性 脑损伤后焦虑样行为的影响

陶惠康 汤琴 戴津津 李媛媛 黑明燕

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的** 观察缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 新生大鼠远期黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达及焦虑样行为的变化以及多巴胺 (DA) 受体拮抗剂干预对其远期焦虑样行为的影响。**方法** 将 120 只 7 日龄 (P7) SD 大鼠分为正常对照组、假手术组、HIBD 组及 HIBD+DA 受体拮抗剂组。Rice 法制作 HIBD 模型; 假手术组予右侧颈总动脉分离, 但不予结扎和低氧处理; HIBD+DA 受体拮抗剂组在造模前后予腹腔注射 DA 受体拮抗剂, 其余组予等量的生理盐水腹腔注射。各组分别于 P14、P21 及 P28 ($n=10$) 进行高架十字迷宫 (EPM) 实验检测动物的焦虑样行为及应用免疫组织化学方法测定其大脑黑质 TH 的表达。**结果** P21 及 P28 时 HIBD 组开放臂停留时间 (OT) 及开放臂次数比率较正常对照组、假手术组及 HIBD+DAR 组增高 ($P<0.05$), 且 HIBD+DAR 组 OT 较正常对照组增高 ($P<0.05$)。P14、P21 及 P28 时 HIBD 组及 HIBD+DAR 组 TH 水平均低于正常对照组及假手术组, 且 HIBD 组低于 HIBD+DAR 组 ($P<0.05$)。**结论** 初生时给予 DA 受体拮抗剂能改善 HIBD 对青春期焦虑样行为的异常作用并能减轻多巴胺能神经元的损伤。[中国当代儿科杂志, 2014, 16 (10): 1045-1050]

[关键词] 多巴胺受体; 缺氧缺血; 焦虑样行为; 酪氨酸羟化酶; 大鼠

Impact of dopamine receptor modulation on reduced anxiety-like behavior in neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage

TAO Hui-Kang, TANG Qin, DAI Jin-Jin, LI Yuan-Yuan, HEI Ming-Yan. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China (Hei M-Y, Email: heiming_yan@aliyun.com)

Abstract: Objective To observe the long-term changes in anxiety-like behavior and tyrosine hydroxylase (TH) expression in the substantia nigra (SN) after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in a neonatal rat model and to further explore the relationship between dopamine (DA) level and long-term anxiety-like behavior using the DA receptor (DAR) antagonist. **Methods** Seven-day-old (P7) neonatal Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into normal control, sham-operated, HIBD and HIBD+DAR antagonist groups. HIBD model was prepared by ligating the right common carotid artery and 8% hypoxia exposure. The rats in the sham-operated group were sham-operated and were not subjected to right common carotid artery ligation and hypoxia exposure. The DAR antagonist was injected intraperitoneally before and after inducing HIBD. The same amount of normal saline was given to the other three groups as a control. Anxiety-like behavior was evaluated by elevated plus maze test, and TH expression in the SN was measured by immunohistochemistry on P14, P21, and P28. **Results** On P21 and P28, the time spent in the open arms and the percentage of open arms entries in the HIBD group were significantly increased compared with those in the normal control, sham-operated and HIBD+DAR antagonist groups ($P<0.05$); in addition, the HIBD+DAR antagonist group showed a significantly longer time spent in the open arms than the normal control group ($P<0.05$). On P14, P21, and P28, TH expression in the HIBD and HIBD+DAR antagonist groups was significantly lower than that in the normal control and sham-operated groups, and TH level in the HIBD group was significantly lower than that in the HIBD+DAR antagonist group ($P<0.05$). **Conclusions** DAR antagonist allows the restoration of anxiety-like behavior and alleviates the damage to dopaminergic neurons in SD rats after HIBD. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(10): 1045-1050]

Key words: Dopamine receptor; Hypoxia-ischemia; Anxiety-like behavior; Tyrosine hydroxylase; Rats

[收稿日期] 2014-04-03; [接受日期] 2014-05-02

[基金项目] 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金 (2013zzts348); 中南大学湘雅三医院 125 人才基金课题。

[作者简介] 陶惠康, 男, 硕士研究生。

[通信作者] 黑明燕, 女, 主任医师。

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是指各种围产期窒息引起的部分或完全缺氧、脑血流减少或暂停所致的新生儿脑损伤,是引起新生儿死亡及神经系统发育障碍的主要原因^[1]。临床研究发现HIE可使儿童在学龄期或青春期出现一系列的行为认知障碍^[2],其中行为障碍分为记忆缺失及多动行为改变,后者包括焦虑冲动行为/焦虑样行为改变^[3],动物研究已证实初生时缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)可导致大鼠在青春期的焦虑样多动行为能力低于正常大鼠^[4]。

多巴胺(dopamine, DA)是中枢神经系统的一种重要神经递质,主要存在于黑质(substantia nigra, SN)和纹状体中,酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是DA合成中关键性的限速酶,TH的表达可以反映多巴胺能神经元的功能^[5]。有研究显示大鼠的多动样行为改变与SN中的DA水平的异常相关联^[6]。本课题前期研究表明HIBD可导致新生Sprague-Dawley(SD)大鼠在14~28d期间TH在SN的表达减少^[7],但对于HIBD后大鼠青春期焦虑样行为改变是否与DA水平的改变存在关联尚无证据。本研究应用新生大鼠HIBD模型,观察HIBD大鼠远期焦虑行为的变化,并通过DA受体拮抗剂的干预来探讨DA水平的改变对HIBD大鼠远期焦虑行为的影响和相关可能机制。

1 材料与方法

1.1 建立新生大鼠HIBD模型

健康新生7日龄(P7)清洁级SD大鼠120只,体重10~16g,由中南大学湘雅三医院动物实验部提供。随机分为正常对照组、假手术组、HIBD组、HIBD+DA受体拮抗剂组4组。每组按出生后第14天(P14)、第21天(P21)和第28天(P28)分为3个亚组($n=10$)。按照Rice法制作HIBD模型,即右侧颈总动脉分离结扎后,置于8%氧气和92%氮气的混合气体中2h;假手术组仅给予右侧颈总动脉分离,不予结扎和低氧处理;HIBD+DA受体拮抗剂组在模型制作前20min给予腹腔注射D1受体拮抗剂SCH23390(0.5 mg/kg,美国Sigma)及D2受体拮抗剂sulpiride(30 mg/kg,美国Sigma),并在制作HIBD模型后的3h内,每

小时给予1次SCH23390(0.2 mg/kg)及sulpiride(3.3 mg/kg)腹腔注射;正常对照组、假手术组及HIBD组腹腔注射等量的无菌生理盐水。

1.2 高架十字迷宫实验测定大鼠焦虑行为

分别于P14、P21及P28对各组采用高架十字迷宫(elevated plus-maze, EPM)实验进行焦虑行为测定,EPM包括两条50 cm×10 cm×10 cm相对开放臂和两条50 cm×10 cm×40 cm相对闭合臂,中央由10 cm×10 cm的区域连接,十字迷宫距离地面50 cm。测试时室内暗光(以1.5 m距离处能区分大鼠细微活动的最低亮度为准)并保持恒亮,室温20℃左右,保持安静。将大鼠从中央区面向开放臂放入迷宫,观察记录5 min内大鼠的活动情况,指标包括:(1)开放臂进入次数(open arm entry, OE):进入到任一开放臂的次数,以大鼠4个爪子均进入到臂内为准,中途一个爪子从该臂中完全退出则为该次进入活动完成;(2)闭合臂进入次数(close arm entry, CE):进入到任一闭合臂的次数,以大鼠4个爪子均进入到臂内为准,中途一个爪子从该臂中完全退出则为该次进入活动完成;(3)总次数:开放臂和闭合臂的次数之和(OE+CE),表示大鼠的运动活力;(4)开放臂停留时间(open arm time, OT):进入开放臂的时间;(5)开放臂次数比率(OE%)=OE/总次数×100%。每只大鼠测试完毕后用湿布将粪便及尿液清除,然后再分别用酒精及干布擦拭干净。

1.3 免疫组织化学测定大鼠黑质TH的表达

实验动物分别于P14、P21、P28经麻醉、心脏灌注、断头取脑,脑组织固定、脱水、包埋后,从脑冠状切面自额叶进行连续切片,切至黑质部位,切片厚度为5 μm,每只大鼠取5张切片。石蜡切片经脱蜡、水化及抗原修复后,经3%过氧化氢室温去除内源性过氧化物酶,封闭缓冲液(10%马血清+0.2% Triton)封闭,一抗(1:500小鼠抗大鼠TH单克隆抗体,美国Chemicon)、二抗(1:400马抗小鼠IgG抗体,美国Vector)及ABC试剂(1:200,美国Vector)孵育后,予DAB显色剂显色,镜下控制反应时间后予常规脱水、透明及封片。用Image Pro Plus图像分析软件(美国Media Cybernetics)分析得出积分光密度(integral optical density, IOD)及测量面积区域(area),再算出平均光密度(平均光密度=IOD/area)进行定量分析,

每张切片随机取3个视野后取平均值。

1.4 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件对数据进行统计学分析。正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。偏态分布数据采用Kruskal walls test多重比较秩和检验,组间两两比较采用Mann Whitney *U*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPM 测定结果

P14时各组间OT比较差异无统计学意义($\chi^2=4.84$, $P=0.19$); P21时各组间OT比较差异有统计学意义($\chi^2=8.25$, $P=0.04$), 其中HIBD组OT较正常对照组($Z=-2.12$, $P=0.03$)、假手术组($Z=-2.42$, $P=0.02$)及HIBD+DA受体拮抗剂组($Z=-2.04$, $P=0.04$)增高, 余组间差异无统计学意义; P28时各组间OT比较差异有统计学意义($\chi^2=18.83$, $P<0.01$), 其中HIBD组OT较正常对照组($Z=-3.70$, $P<0.01$)、假手术组($Z=-3.33$, $P<0.01$)及HIBD+DA受体拮抗剂组($Z=-2.04$, $P=0.04$)增高, HIBD+DA受体拮抗剂组较正常对照组增高($Z=-2.08$, $P=0.04$), 余组间差异无统计学意义。见图1。

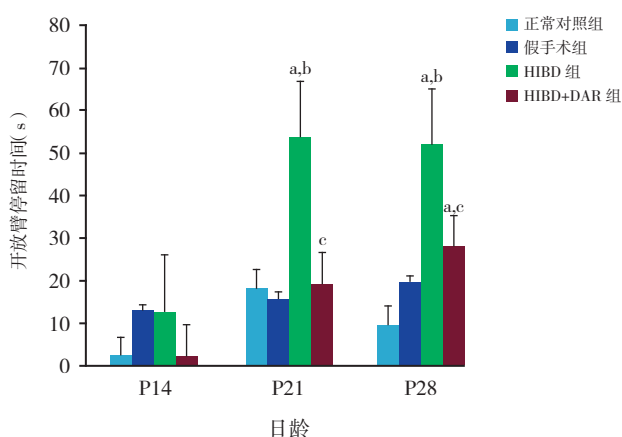


图1 不同日龄各组开放臂停留时间比较 ($n=10$)

a示与对照组比较, $P<0.05$; b示与假手术组比较, $P<0.05$; c示与HIBD组比较, $P<0.05$ 。

P14时各组间OE%比较差异无统计学意义($\chi^2=4.14$, $P=0.25$); P21时各组间OE%比较差

异有统计学意义($\chi^2=11.65$, $P=0.01$), 其中HIBD组OE%较正常对照组($Z=-2.03$, $P=0.04$)、假手术组($Z=-2.71$, $P<0.01$)及HIBD+DA受体拮抗剂组($Z=-2.79$, $P<0.01$)增高, 余组间差异无统计学意义; P28时各组间OE%比较差异有统计学意义($\chi^2=16.31$, $P<0.01$), 其中HIBD组OE%较正常对照组($Z=-3.36$, $P<0.01$)、假手术组($Z=-6.61$, $P<0.01$)及HIBD+DA受体拮抗剂组($Z=-2.55$, $P=0.01$)增高, 余组间差异无统计学意义。见图2。

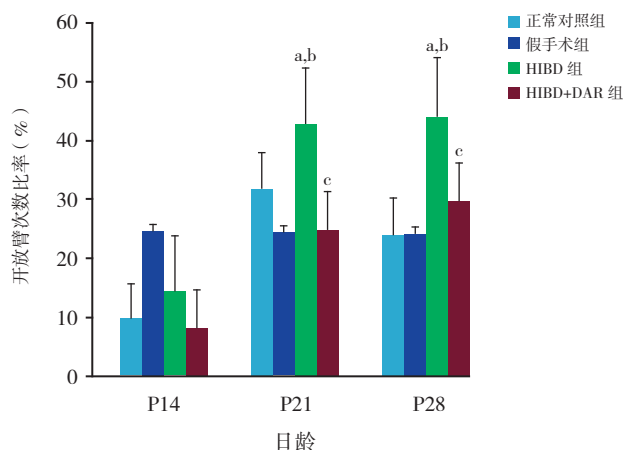


图2 不同日龄各组开放臂次数比率比较 ($n=10$)

a示与正常对照组比较, $P<0.05$; b示与假手术组比较, $P<0.05$; c示与HIBD组比较, $P<0.05$ 。

P14 ($\chi^2=5.73$, $P=0.12$)、P21 ($\chi^2=1.17$, $P=0.75$)及P28 ($\chi^2=4.72$, $P=0.19$)时各组间总次数比较差异均无统计学意义, 见图3。

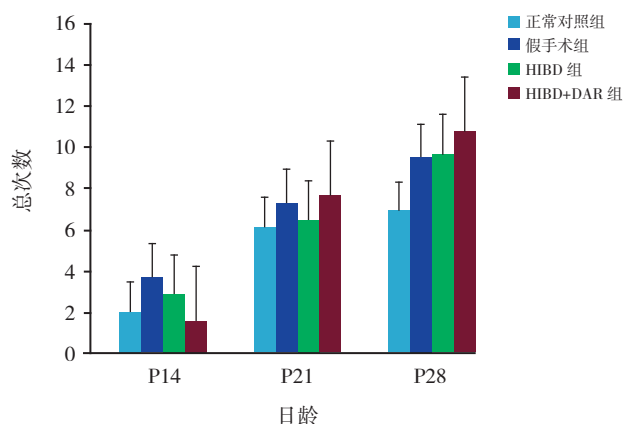


图3 不同日龄各组总次数比较 ($n=10$)

2.2 黑质 TH 检测结果

各组 P14、P21、P28 黑质 TH 平均光密度比较差异均有统计学意义 ($F=18.84、11.39、15.20$, 均 $P<0.01$), 其中 HIBD 组及 HIBD+DA 受体拮抗剂组在各时间点 TH 水平均低于正常对照组及假手术组, 且 HIBD 组低于 HIBD+DA 受体拮抗剂组 ($P<0.05$), 见表 1, 图 4。

表 1 各组黑质 TH 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	P14	P21	P28
正常对照组	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.02
假手术组	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.03
HIBD 组	$0.21 \pm 0.03^{a,b}$	$0.23 \pm 0.03^{a,b}$	$0.23 \pm 0.02^{a,b}$
HIBD+DA 受体拮抗剂组	$0.26 \pm 0.01^{a,b,c}$	$0.26 \pm 0.03^{a,b,c}$	$0.27 \pm 0.02^{a,b,c}$

注: a 示与正常对照组比较, $P<0.05$, b 示与假手术组比较, $P<0.05$, c 示与 HIBD 组比较, $P<0.05$ 。

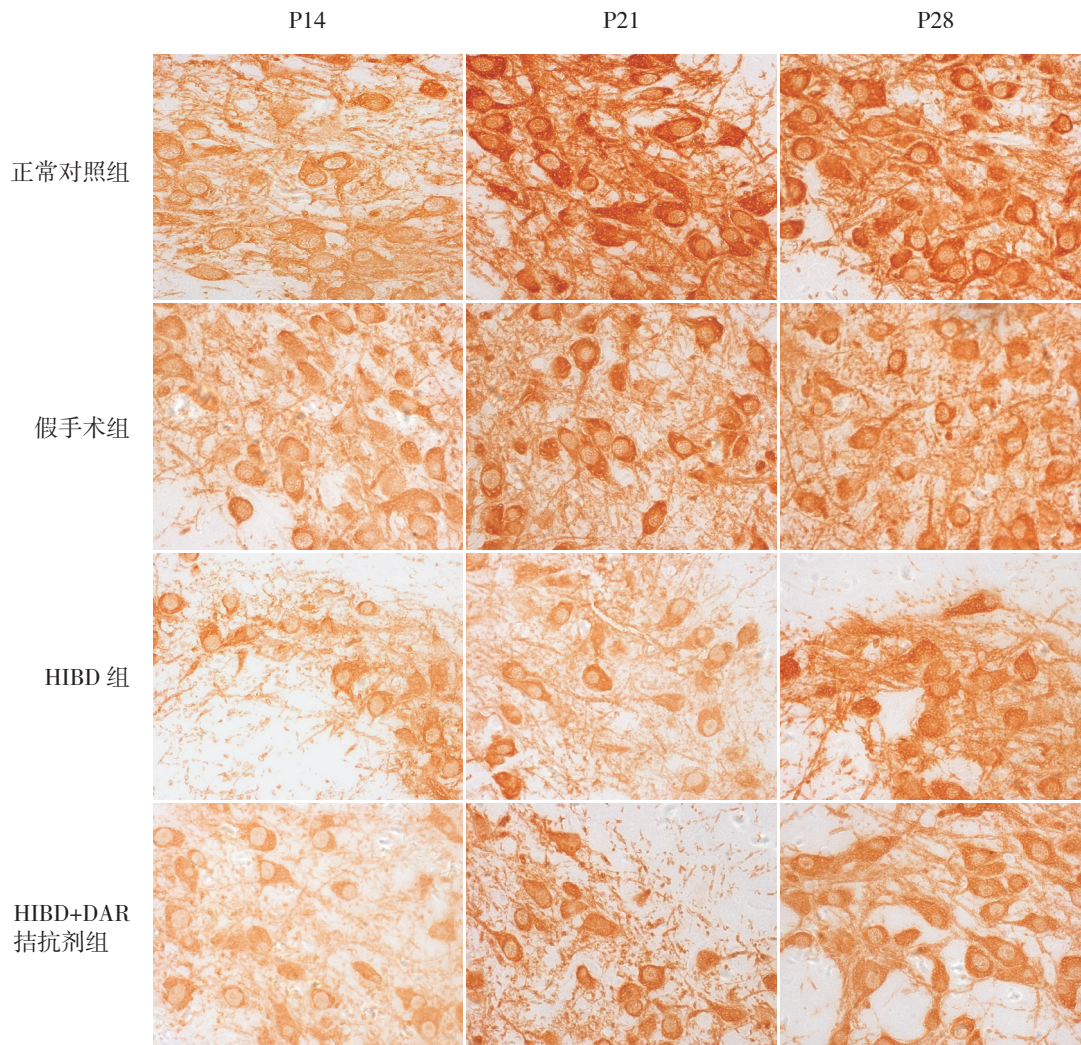


图 4 各组各时间点黑质 TH 免疫组化染色 (DAB 显色, $\times 400$) TH 阳性反应物分布在细胞质, 染色呈棕黄色。HIBD 组在 P14、P21、P28 时的黑质 TH 染色细胞数量较正常对照组及假手术组减少, HIBD+DA 受体拮抗剂组在 P14、P21、P28 时的黑质 TH 染色细胞数量较 HIBD 组有所增加, 但仍低于正常对照组及假手术组。

3 讨论

EPM 是众多焦虑动物模型评价中较为成熟的经典方法, 其原理是利用大鼠对未知新环境喜好探究的特性, 当其处于高悬开臂后又形成恐惧的心理, 造成矛盾的心理应激, 模拟焦虑样症状。

大鼠对高悬而空旷的开放臂的选择偏好与其焦虑程度呈负相关, 即在开放臂的时间延长、次数增多提示大鼠焦虑程度降低。抗焦虑药物能抑制开放臂的回避, 增加开放臂的次数和时间, 而总次数可以反映动物的运动活性。7 日龄 SD 大鼠脑组织结构与 32~34 孕周龄的人脑类似^[8], 21~28 d SD

大鼠则接近成年期,因此14~28 d常被用于研究SD大鼠动物的青春期行为问题^[9]。本研究通过对7日龄新生SD大鼠进行HIBD造模,在P14、P21及P28观察其焦虑行为,结果显示P14时各组比较各指标均无统计学差异,而P21及P28时HIBD组的OT及OE%较正常对照组和假手术组增加,提示新生期的HIBD能使大鼠的青春期焦虑行为降低。P14时各组指标比较差异无统计学意义,主要原因是大鼠的活力较弱,不能进行有效的来回活动所致。在P21及P28时各组的总活力无统计学差异,可排除了HIBD组的焦虑行为降低是由于其活动力减弱所造成的。在HIBD造模前及造模中腹腔注射D1及D2受体拮抗剂后,结果示使用了DA受体拮抗剂后的SD大鼠在P21及P28的OT及OE%较HIBD组减少,提示了DA受体拮抗剂能改善HIBD损伤后SD大鼠青春期的焦虑样行为。

DA是儿茶酚胺类神经递质,TH是合成多巴胺的限速酶,抑制或提高该酶的活性可大幅度影响DA的合成,TH的免疫组织化学常被用于显示DA能神经元的胞体和突触^[10]。中脑黑质是DA能神经元较为集中的区域^[11]。本研究结果显示HIBD组的黑质TH表达较正常对照组及假手术组减少,提示HIBD能导致多巴胺神经元的减少,使用了DA受体拮抗剂后的SD大鼠在P14、P21及P28均比HIBD组表达的高,但低于正常对照组和假手术组,显示了DA受体拮抗剂能减轻HIBD对脑神经元的损伤。

有研究表明黑质纹状体处的DA能神经元对脑缺氧缺血表现出易感性^[9],在脑缺血模型中摧毁单侧的DA能神经元黑质通路后纹状体坏死体积明显减少。细胞外DA主要通过其受体发挥作用,根据其生化和药理性质,可分为D1类受体和D2类受体,D1类受体包括D1和D5受体,D2类受体包括D2、D3和D4受体^[12]。大量实验数据证明了D1受体拮抗剂SCH23390具有抗脑缺血的损伤作用,其机制主要为脑缺氧缺血时细胞外液大量的DA通过突触后膜D1受体激活了cAMP瀑布反应,最终导致细胞内钙超载,使神经元损伤。赵菁等^[13]研究表明了D2受体介导了脑缺血时多巴胺的神经毒性作用,而使用D2受体拮抗剂具有神经保护作用。本研究在HIBD前使用D1和D2受体拮抗剂,阻断DA与其受体发生作用,结果表明了DA受体

拮抗剂具有神经保护作用,其机制可能为DA受体拮抗剂阻断了受体介导的钙超载,减轻缺氧缺血性损伤,降低神经功能的受损程度。

目前D1及D2受体对焦虑行为的影响还未明确^[14-15]。本研究发现HIBD+DA受体拮抗剂组比HIBD组在其青春期的焦虑行为有所增加,提示多巴胺水平的变化与HIBD对青春期焦虑行为的改变有关,其可能机制为在新生期时应用DAR拮抗剂能减轻HIBD对DA能神经元的损伤作用,DA能神经元损伤较HIBD组轻,使其在青春期释放的DA较HIBD组多,因DA的释放的增加与焦虑行为有关,导致该组在HIBD对青春期焦虑行为恢复到正常水平。

综合以上所得,HIBD后大鼠青春期焦虑样行为的变化与多巴胺能神经元损伤有关,初生时给予DA受体拮抗剂能改善HIBD对青春期焦虑样行为的异常作用,提示多巴胺水平的变化与HIBD对青春期焦虑行为的改变有关,但具体相关机制尚不清楚,需进一步研究为HIE的治疗提供一定的实验室依据。

[参 考 文 献]

- [1] Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(2): 156-166.
- [2] Odd DE, Whitelaw A, Gunnell D, et al. The association between birth condition and neuropsychological functioning and educational attainment at school age: a cohort study[J]. *Arch Dis Child*, 2011, 96(1): 30-37.
- [3] Nyakas C, Buwalda B, Luiten PG. Hypoxia and brain development[J]. *Prog Neurobiol*, 1996, 49(1): 1-51.
- [4] Hei MY, Luo YL, Zhang XC. Hypoxic-ischemic injury decreases anxiety-like behaviour in rats associated with loss of tyrosin hydroxylase immunoreactive neurons of the substantia nigra[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 41(1): 13-19.
- [5] Busceti CL, Bucci D, Molinaro G, et al. Lack or inhibition of dopaminergic stimulation induces a development increase of striatal tyrosine hydroxylase-positive interneurons[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44025.
- [6] Golden JP, DeMaro JA, Knoten A, et al. Dopamine-dependent compensation maintains motor behavior in mice with developmental ablation of dopaminergic neurons[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(43): 17095-17107.
- [7] 汤琴,刘芙蓉,罗娅丽,等. 胰岛素样生长因子-1对缺氧缺血性脑损伤大鼠远期焦虑行为的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(3): 295-300.
- [8] Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. *J Neurosci Res*,

- 1999, 55(2): 158-163.
- [9] Fan LW, Lin S, Pang Y, et al. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat[J]. Behav Brain Res, 2005, 165(1): 80-90.
- [10] Pagida MA, Konstantinidou AE, Tsekoura E, et al. Vulnerability of the mesencephalic dopaminergic neurons of the human neonate to prolonged perinatal hypoxia: an immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase expression in autopsy material[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2013, 72(4): 337-350.
- [11] Aumann TD, Egan K, Lim J, et al. Neuronal activity regulates expression of tyrosine hydroxylase in adult mouse substantia nigra pars compacta neurons[J]. J Neurochem, 2011, 116(4): 646-658.
- [12] Chun LS, Free RB, Doyle TB, et al. D1-D2 dopamine receptor synergy promotes calcium signaling via multiple mechanisms[J]. Mol Pharmacol, 2013, 84(2): 190-200.
- [13] 赵菁, 徐超, 王忠诚. 多巴胺 D2、D3 受体在大鼠暂时性局灶性脑缺血中的作用[J]. 中华神经外科杂志, 2002, 18(3): 160-163.
- [14] Hou I, Suzuki C, Kanegawa N, et al. β -Lactotensin derived from bovine β -lactoglobulin exhibits anxiolytic-like activity as an agonist for neurotensin NTS2 receptor via activation of dopamine D1 receptor in mice[J]. J Neurochem, 2011, 119(4): 785-790.
- [15] de la Perez Mora M, Jacobsen KX, Crespo-Ramirez M, et al. Wiring and volume transmission in rat amygdala. Implications for fear and anxiety[J]. Neurochem Res, 2008, 33(8): 1618-1633.
- (本文编辑: 王庆红)

· 消息 ·

《中国小儿急救医学》2015 年度征订征稿启事

《中国小儿急救医学》是中华人民共和国卫生部主管, 中华医学会和中国医科大学主办的中华医学会系列杂志之一, 是国内儿科领域中惟一一本反映危重症急救方面的国家级专业学术期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊, 中国科技类核心期刊, 美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich's Periodicals Directory)、W H O 西太平洋地区医学索引 (Western Pacific region Index Medicus, WPRIM) 收录期刊, 曾荣获全国医药卫生优秀期刊二等奖和中华医学会系列杂志优秀期刊二等奖。本刊设有专家笔谈、论著、临床应用研究、综述与讲座、儿科急诊室、教学查房、继续医学教育、临床病例(理)讨论、病案报告等栏目。主要读者对象为全国各级医院的儿科医生, 尤其是 PICU、NICU 或急诊室的儿科医生。

本刊为月刊, 每月 20 日出版, 国内外公开发行, 刊号为 CN11-5454/R, ISSN 1673-4912。每期定价 10 元, 全年 120 元。通过邮局发行, 邮发代号 8-72。欢迎广大读者订阅。漏订者可汇款至《中国小儿急救医学》编辑部, 联系地址: 沈阳市和平区三好街 36 号, 邮编: 110004。汇款时, 请写清收件人的姓名、详细地址、邮编及所订杂志的期号和册数, 不另寄邮费。

网上投稿系统网址: <http://www.cma.org.cn/ywzx/ywzx.asp>; 联系电话: 024-23926295/024-96615 转 13729; Email: zgxejjyx@163.com

欢迎广大儿科临床医生积极投稿并订阅杂志!

《中国小儿急救医学》编辑部

2014 年 9 月 20 日