

211-216

9

腹腔注射对氯苯丙氨酸对达乌尔黄鼠冬眠的影响*

黄钦恒 蔡益鹏
(北京大学生物学系, 北京, 100871)

张崇理[△] 王红
(中国科学院动物研究所)

2959.837

摘 要

本工作采用腹腔注射5-羟色胺合成抑制剂对氯苯丙氨酸降低脑内5-HT含量的方法, 观察了脑内5-HT系统在达乌尔黄鼠自然冬眠和脑室注射6-羟多巴胺促进入眠效应中的作用。结果表明, 在自然情况下, 达乌尔黄鼠入眠后脑内5-HT含量增加, 腹腔注射对氯苯丙氨酸后动物入眠诱导期明显延长, 在脑室注射6-羟多巴胺人为地降低脑内NE系统活动的条件下, 脑内5-HT含量即使处于较低水平, 动物也能很快入眠, 但入眠时脑内5-HT含量需要恢复到一定的基础水平。提示脑内NE系统功能活动的降低或/和5-HT系统功能活动加强同是触发动物入眠的重要因素。周期性入眠和觉醒可能依赖于脑内这两个系统功能活动的平衡。

关键词 达乌尔黄鼠; 冬眠; 对氯苯丙氨酸; 5-羟色胺; 去甲肾上腺素

氯苯丙氨酸

前人的工作已说明脑内5-HT系统活动加强有利于动物的冬眠入眠 (Kudryavtseva等, 1973; Novotna等, 1975; Jansky等, 1978; Wang, 1982), 降低脑内5-HT含量可阻止动物入眠 (Spafford等, 1971), 从而认为脑内5-HT活动增强为冬眠入眠和维持所必须。本实验室以前的工作也证实冬眠黄鼠脑内5-HT含量比常温黄鼠显著增高 (蔡益鹏等, 1992), 但是脑室注射6-羟多巴胺 (6-OHDA), 人为地降低脑内儿茶酚胺系统的功能活动能促进达乌尔黄鼠 (*Citellus dauricus*) 进入冬眠, 此时除了脑内NE和DA大量减少外, 5-HT含量亦有少量降低; 入眠后脑内5-HT及其代谢产物5-HIAA含量也明显低于自然冬眠的达乌尔黄鼠 (Cai等, 1989; 蔡益鹏等, 1992)。提示在脑室注射6-OHDA使脑内NE系统活动降低的情况下, 即使脑内5-HT活动并不加强, 动物亦能入眠。为了进一步探讨5-HT系统在冬眠中的作用, 本工作采用腹腔注射5-HT合成抑制剂对氯苯丙氨酸 (pCPA), 观察人为地降低脑内5-HT含量对达乌尔黄鼠自然冬眠和脑室注射6-OHDA促眠作用的影响。

材料和方法

1. 动物 所用达乌尔黄鼠是从山西阳高地区野外捕来, 在自然光照和室温条件下

* 国家自然科学基金资助项目
本文于1991年4月26日收到, 1993年1月18日收到修改稿。

4318

单笼饲养半年,已经习服于饲养环境的健康成年个体。本实验共用黄鼠57只,雌雄不拘,体重290—320克。

2. 腹腔注射对氯苯丙氨酸(pCPA)悬液 pCPA悬液的配制参考Koe等(1966)的方法。将所需的pCPA粉剂加入到pH=10的生理盐水中(用5摩尔每升NaOH配制),然后加入5摩尔每升的HCl,将pH值调整到1.8,使pCPA沉淀,然后加入一、二滴Poly-sorbate 80,搅匀后成为悬液。所用悬液的浓度为200毫克/毫升。实验动物腹腔注射400毫克/公斤剂量的pCPA悬液,对照动物腹腔注入0.5毫升pH=1.8的生理盐水。

3. 脑室注射6-羟多巴胺(6-OHDA) 实验动物用戊巴比妥钠(35毫克/公斤, i.p.)麻醉后,固定于立体定位仪上(Narishige 日本),参照Joseph等(1966)十三线地松鼠脑定位图谱,用微量注射器直接向两侧脑室(坐标: A5.3, LR1.7, H4.0)各注入100微克/10微升的6-OHDA。6-OHDA用含0.2%抗坏血酸生理盐水配制,配制后4℃保存不超过24小时。对照组动物采用同样的方法向两侧脑室各注入10微升的6-OHDA配药液。注药速度为10微升/5分钟,注药后留针2分钟。

4. 脑组织单胺类神经递质含量测定 动物用快速斩头法处死后迅速取出全脑,投入液氮内快速冷冻后称重,然后置-60℃冰箱储存。测定时,将脑标本放入匀浆器内,加入10倍体积预冷的0.2摩尔每升PCA溶液,在冰浴中制成匀浆,4℃离心12 000 rpm×25 min,取上清液用高效液相层析—电化学检测仪(HPLC为150系列,电化学检测仪为LC-4B)测定其中去甲肾上腺素(NE),5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)含量(张崇理等,1987)。

5. 入眠诱导期时间的观察 实验中,将待观察入眠诱导期时间的动物放入 $5 \pm 2^\circ\text{C}$ 的冷室,光照周期维持在L:D=1:23,每日晚8:00给以足量的大白鼠饲料和新鲜蔬菜。用半导体温度计(上海医用仪表厂)每日测量胸前皮肤温度作业判断动物是否进入冬眠的指标。当动物皮温从正常的 32°C 左右下降到与环境温度相近($7-10^\circ\text{C}$)时,即认为该动物已处于冬眠状态。将动物进入冷室到入眠这段时间称为入眠诱导期。

6. 药品 实验所用的6-羟多巴胺、对氯苯丙氨酸,测递质含量所用的标准去甲肾上腺素、5-羟色胺和多巴胺均系Sigma公司产品。

7. 统计学处理 各组数据以均数±标准差表示,组间差别显著性用Student's-t检验确定。

结 果

1. 腹腔注射pCPA对脑内单胺类神经递质含量的影响

25只黄鼠分别在腹腔注射pCPA后的第2、4、8、12和16天断头处死(每次处死5只),取脑测递质含量。另用5只黄鼠腹腔注射pH=1.8生理盐水,作为对照组,观察腹腔注射pCPA对脑内NE、DA和5-HT含量的影响。测定结果表明:在腹腔注射pCPA后第2天,全脑5-HT含量降低到对照动物的42%,在第4天,脑内5-HT含量达最低点,为对照动物的19%,随后5-HT含量逐渐恢复,第16天时恢复到84%。脑内NE和DA含量在注射pCPA后亦有下降,其变化趋势和5-HT一样,在第4天达最低点,以后随时间逐渐恢复,第16天时NE和DA含量分别恢复到对照的91%和97%(图1)。

2. 经不同处理的达乌尔黄鼠入眠诱导期

将27只黄鼠随机分为4组。I组(n=5),腹腔注射生理盐水+脑室注射6-OHDA配

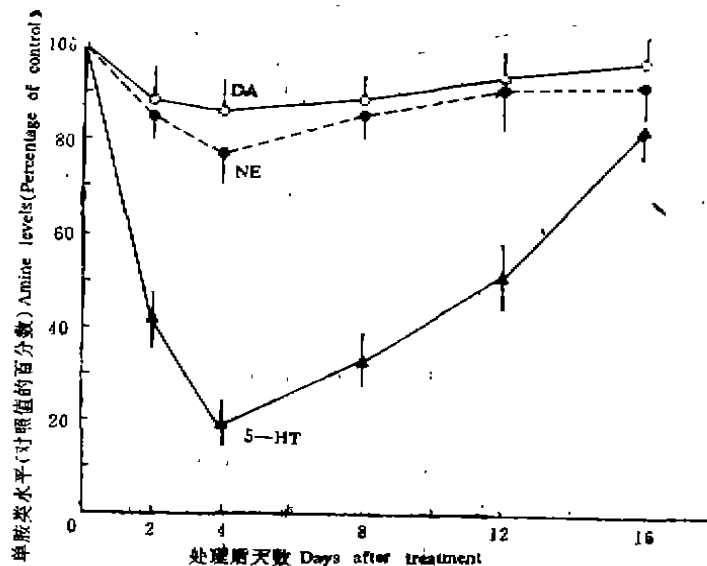


图1 腹腔注射对氯苯丙氨酸对达乌尔黄鼠脑内NE、5-HT和DA含量的影响(400毫克/千克)。数值为平均值±标准差。对照动物的平均值为:NE=410毫克/克,5-HT=420毫克/克;DA=660毫克/克(分母为脑组织重量)

Fig.1 NE, 5HT and DA concentration in brain of ground squirrels at different times after intraperitoneal injection of p-chlorophenylalanine (400mg/kg). Each value is the mean±S.D; for 5 animals. Mean values for control animals were, NE=410 ng/g (brain tissue), 5-HT=420ng/g, DA=660ng/g.

药液; II组(n=6), 腹腔注射pCPA+脑室注射6-OHDA配药液; III组(n=9), 腹腔注射pCPA+脑室注射6-OHDA; IV组(n=7), 腹腔注射生理盐水+脑室注射6-OHDA。腹腔注入生理盐水的容积为0.5毫升, 脑室注射在腹腔注射4天后进行。脑室注入6-OHDA配药液的体积为20微升, 6-OHDA的剂量为200微克/20微升。脑室注药后动物在室温下恢复24小时, 然后放入冷室, 观察其入眠诱导期时间。结果表明: I组动物的入眠诱导期时间为 26 ± 6 天, 比II组动物入眠诱导期(35 ± 5 天)明显缩短($P < 0.05$); III组动物的入眠诱导期时间为 15 ± 4 天, 比IV组动物入眠诱导期(8 ± 2 天)明显延长($P < 0.05$)(表1)。

3. 经不同处理的达乌尔黄鼠入眠时脑内单胺类神经递质含量

上述4组黄鼠分别在入眠后的第2天处死, 测全脑单胺类递质含量。另用5只黄鼠, 腹腔注入0.5毫升pH=1.8的生理盐水, 4天后两侧脑室各注入10微升的6-OHDA配药液, 放入冷室一周, 在尚未入眠时断头处死测单胺类递质含量作为对照。结果见表2, 值得注意的是III、IV组的结果: III组动物(i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA)入眠时脑内NE和DA含量分别为对照动物的37%和75%, 5-HT含量为对照的85%; IV组动物(i.p.Saline+i.c.v.6-OHDA)入眠时脑内NE和DA含量分别为对照动物的42%和72%, 5-HT含量为对照的95%。表明在6-OHDA使NE活动受到严重抑制的情况下, 5-HT含量不必增高, 甚至适当降低, 动物仍能实现冬眠。

表 1 不同处理达乌尔黄鼠的入眠诱导期

Table 1 Induction period for hibernation in the ground squirrel treated with various treatments

分组 Group	动物数 Numbr of animals	处 理 Treatment	冬眠诱导期(日) Induction period for hibernation (days)
I	5	腹腔注射生理盐水 + 脑室注射6-OHDA配药液 i.p.saline+i.c.v.6-OHDA vehicle	28 ± 6
II	6	腹腔注射对氯苯丙氨酸 + 脑室注射6-OHDA配药液 i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA vehicle	36 ± 5
III	9	腹腔注射对氯苯丙氨酸 + 脑室注射6-OHDA i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA	15 ± 4
IV	7	腹腔注射生理盐水 + 脑室注射6-OHDA i.p.saline+i.c.v.6-OHDA	8 ± 2

表内数值为平均值 ± 标准差 Values are mean ± SD, I—II, P<0.05, II—IV, P<0.05, I—III, P<0.05, I—IV, P<0.001

表 2 不同处理达乌尔黄鼠脑内单胺类神经递质的含量

Table 2 Mean relative concentration of NE, 5-HT and DA in whole brain of hibernating ground squirrel treated with various methods

分组 Group	动物数 Number of animals	处 理 Treatment	对 照(%) Control (%)		
			去甲肾上腺素 NE	5-羟色胺 5-HT	多巴胺 DA
I	5	腹腔注射生理盐水 + 脑室注射6-OHDA配药液 i.p.saline+i.c.v.6-OHDA vehicle	98.1	120.8	98.4
II	6	腹腔注射对氯苯丙氨酸 + 脑室注射6-OHDA配药液 i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA vehicle	97.4	112.7	98.2
III	9	腹腔注射对氯苯丙氨酸 + 脑室注射6-OHDA i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA	37.7	85.4	75.6
IV	7	腹腔注射生理盐水 + 脑室注射6-OHDA i.p.saline+i.c.v.6-OHDA	42.4	95.7	72.3

讨 论

自1966年Koe和Weissman报道 pCPA可以选择性抑制色氨酸羟化酶, 阻断5-HT合成, 减少中枢和外周组织中 5-HT 含量以来, 该工作受到高度重视并得到了许多工作的证实。由于pCPA阻断5-HT合成效果确切, 其作用易被 5-HTP所逆转, 因而它作为一种工具药被广泛应用。本实验给达乌尔黄鼠腹腔一次注射400毫克/公斤的 pCPA, 其作用缓慢, 在注药后第4天使脑内 5-HT 含量降低80%, 达最低点, 一周后开始恢复, 二周后恢复到80%以上。由于 pCPA对酪氨酸羟化酶也有轻度的短暂抑制, 在腹腔注射 pCPA后, 脑内 NE 和 DA 含量降低10%—20%, 随后逐渐恢复。达乌尔黄鼠腹腔注射 pCPA后脑内单胺类神经递质含量减少程度和变化趋势与 Koe等(1966)在大白鼠上所观

察到的现象基本一致,表明pCPA对达乌尔黄鼠和大白鼠的作用没有明显差异。

本工作对达乌尔黄鼠入眠诱导期和入眠时脑内单胺类神经递质含量测定表明:Ⅱ组动物(i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA配药液)入眠诱导期比Ⅰ组动物(i.p.Saline+i.c.v.6-OHDA配药液)明显延长,显示腹腔注射pCPA使脑内5-HT含量减少的结果。对入眠时脑内单胺类神经递质含量测定(表2)表明这两组动物入眠时脑内NE含量与常温动物基本相同,但5-HT含量明显超过常温动物,提示在脑内NE含量不受影响的情况下,达乌尔黄鼠入眠和冬眠状态的维持需要脑内5-HT系统活动加强(因为此时脑内不但5-HT含量增加,而且5-HTAA含量亦增加。比较Ⅱ组和Ⅲ组动物(i.p.pCPA+i.c.v.6-OHDA)可以发现,此两组动物在相同时间内腹腔注入同剂量的pCPA,但由于Ⅲ组动物脑室又注射6-OHDA,减低脑内NE系统活动水平,其入眠诱导期比Ⅱ组动物明显缩短,且入眠时脑内5-HT含量仅恢复到对照动物的85%,这提示在脑内NE系统活动水平降低的情况下,脑内5-HT系统即使处于较低的活动水平动物亦可很快入眠。比较Ⅲ组和Ⅳ组动物(i.p.Saline+i.c.v.6-OHDA)的入眠诱导期和入眠时脑内单胺类神经递质含量可见,Ⅲ、Ⅳ两组动物脑室同时注入同剂量的6-OHDA,入眠时脑内NE含量基本相同,但Ⅲ组动物由于预先腹腔注入pCPA,脑内5-HT含量减少,因而入眠诱导期比Ⅳ组动物明显延长。这提示在脑室注射6-OHDA情况下,脑内5-HT系统处于较低水平动物即可入眠,但脑内5-HT含量还必须维持一个基础水平,低于这个基础水平,即使脑内NE系统活动降低,动物也不能入眠。

综上所述,这些结果清楚地揭示了脑内NE和5-HT系统在调节和控制达乌尔黄鼠冬眠入眠中的作用及其相互关系,脑内NE系统功能活动的降低或/和5-HT系统功能活动加强同是触发入眠的重要因素,周期性入眠和觉醒依赖于这两个系统的功能活动平衡。在脑内注射6-OHDA使脑内NE大量减少的情况下,脑内5-HT系统处于较低的活动水平动物仍可入眠,但此时脑内5-HT含量必需保持一定的基础水平。

参 考 文 献

- 张崇理,王红.1987.高压液相—电化学检测仪(LCEC)在神经递质测定中的应用.生理通讯增刊号,3:42—43.
 蔡益麟,黄钦恒,赵海青,张崇理,王红.1992.脑室注射6-羟多巴胺对黄鼠冬眠的影响.生理学报,44(2):175—180.
 Cai Y P, Zhao H Q, Huang Q H.1989. Revaluation of norepinephrine and serotonin in initiation of hibernation. In: Malan A, Canguilhem B, editors. Living in the cold, 2nd international symposium. John Libbey Eutotext and INSERM, 477—484.
 Jansky L. 1978. The sequence of physiological changes during hibernation, the significance of serotonergic pathways. In: Wang I C H, Hudson J W, editors. Strategies in cold, natural torpidity and thermogenesis. New York, Academic Press, 299—326.
 Joseph S A, Knigge K A, Kalejs L M, Hoffman H A, Reid P. 1966. A stereotaxic atlas of the brain of the 13-line ground squirrel (*Citellus tridecemlineatus*). US Army Edgewood Arsenal Special Publication. Maryland.
 Koe B K, Weissman A. 1966. A specific depletor of brain serotonin. *J Pharmacol Exp Ther*, 154:499—516.
 Kudryavtseva N N, Popova N K.1973. Serotonin content in various portions of the brain during hibernation and awakening. *Bull Exp Biol Med*, 75:44—47.
 Novotna R, Jansky L, Drahota Z.1975. Effect of hibernation on serotonin metabolism in the brain stem of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Gen Pharm*, 6:23—26.
 Spafford D C, Pengelly E T. 1971. The influence of the neurohumor serotonin on hibernation in the golden-mantled ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp Biochem Physiol*, A 38A:259—250.
 Wang I C H.1982. Role of brain monoamines on control of endocrine function and thermoregu-

lation. In, C P Lyman, J S Willis, A Malan, L C H Wang, editors, Hibernation and torpor in mammals and birds. New York, Academic Press, 211—214.

THE ROLE OF BRAIN SEROTONERGIC SYSTEM IN HIBERNATION OF GROUND SQUIRREL

HUANG Qinheng CAI Yipeng

(Department of Biology, Peking University, Beijing, 100871)

ZHANG Chongli WANG Hong

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

In this work the role of brain serotonergic system in natural hibernation and hibernation induced by i.c.v. injection of 6-hydroxydopamine were studied in ground squirrel (*Citellus dauricus*) after intraperitoneal administration of para-chlorophenylalanine (pCPA), a specific depletor of brain serotonin. The results showed: (1) The content of 5-HT in whole brain, after pCPA injection was depleted to 42% of control value at 2nd day, and reached to the lowest at 4th day, about 19% of control, then gradually recovered with time, arrived at 84% of control value at 16th day. (2) In the natural hibernating ground squirrels, the induction period for hibernation were 26 ± 6 days, and 5-HT content in brain increased when compared with the euthermic animals, while the induction period for hibernation in ground squirrels pretreated with pCPA were 35 ± 5 days, significantly longer than that of natural hibernating animals. (3) The ground squirrels treated with i.p. pCPA + i.c.v. 6-OHDA were able to enter into hibernation when 5-HT content in brain has not recovered to the control level, however the induction period for hibernation (15 ± 5 days) was longer than that of animals treated with i.p. saline + i.c.v. 6-OHDA, indicating that a basal 5-HT level was still necessary for hibernating under the condition of i.c.v. injection of 6-OHDA.

These results suggested that both the decrease of NE system activity or/and the increase of 5-HT system in brain are the important controlling factors in triggering the onset of hibernation.

Key words: Ground squirrel (*Citellus dauricus*), Hibernation, Para-Chlorophenylalanine, Serotonin, Norepinephrine