生理学报 *Acta Physiologica Sinica*, December 25, 2020, 72(6): 777–784
DOI: 10.13294/j.aps.2020.0085 http://www.actaps.com.cn

研究论文

慢性应激增加大鼠海马齿状回的多巴胺水平并损伤空间学习记忆能力

赵 可[2]，任 鹏[1]，李明月[1]，金清华[1]，肖 斌[1,*]

[1]延边大学医学院生理与病理生理学教研室，延吉 133002；[2]白城医学高等专科学校生理学教研室，白城 137000

摘 要：本研究旨在揭示慢性应激(chronic stress, CS)对空间学习和记忆活动过程中大鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)的多巴胺(dopamine, DA)水平及突触效能的影响。Sprague Dawley (SD)大鼠随机分成对照组和CS组(n = 10)，CS组大鼠接受慢性温和不可预知应激原处理，对照组不给予应激处理，用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中肾上腺素和皮质酮(corticosterone, CORT)的水平，用Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)评估大鼠的空间学习和记忆能力；用在体生物电记录法、脑部微量透析结合高效液相色谱法检测大鼠在学习和记忆活动中DG区场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)幅值及细胞外液中DA水平的动态变化；用免疫组织化学染色或免疫蛋白印迹法检测DA的D1受体(D1 receptor, D1R)和下游通路关键蛋白在DG区的表达变化。结果显示，CS大鼠处于应激状态，表现为血清中肾上腺素和CORT水平明显升高(P < 0.05)；CS大鼠的空间学习和记忆能力下降，其学习过程中DG区突触传递效能也显著降低，表现为MWM训练第3天时，对照组大鼠DG区的fEPSP幅值与训练前比较显著升高(P < 0.05)，而CS组却无明显改变，与对照组比较有显著差异(P < 0.05)；CS大鼠DG区的DA水平在学习的第1、2、3天均明显升高，与训练前及对照组比较均有显著差异(P < 0.05)；和对照组相比，CS组大鼠海马DG区的D1R表达显著上调，其下游通路中磷酸化的蛋白激酶A (protein kinase A, PKA)、cAMP反应元件结合蛋白(cyclic AMP-response element binding protein, CREB)和脑源神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平显著下调(P < 0.05)。以上结果提示，CS可能通过影响海马DG区突触传递效能和DA水平损伤大鼠的空间学习和记忆功能。

关键词：慢性应激；空间学习和记忆；齿状回；多巴胺
中图分类号：Q427；R338.6

Chronic stress increases dopamine levels in hippocampal dentate gyrus and impairs spatial learning and memory in rats

ZHAO Ke[2], REN Peng[1], LI Ming-Yue[1], JIN Qing-Hua[1], XIAO Bin[1,*]

[1]*Department of Physiology and Pathophysiology, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China;* [2]*Department of Physiology, Baicheng Medical College, Baicheng 137000, China*

Abstract: The objective of this study was to elucidate the effect of chronic stress (CS) on dopamine (DA) level and synaptic efficiency in the hippocampal dentate gyrus (DG) during spatial learning and memory. Sprague Dawley (SD) male rats were randomly divided into control group and CS group (n = 10). CS group was treated with chronic mild unpredictable stress, and control group did not receive any treatments. The levels of epinephrine and corticosterone (CORT) in serum were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the spatial learning and memory abilities of rats were measured by Morris water maze (MWM) test. Meanwhile, the amplitude of field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) and concentration of DA in the DG region were determined by *in vivo*

Received 2020-01-31 Accepted 2020-09-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31560278), the Scientific Research Foundation of Education Department of Jilin Province, China (No. JJKH20191137KJ), and the Scientific Research Foundation for Scholars of Yanbian University, China (No. 602018033).

*Corresponding author. Tel: +86-433-2435133; E-mail: xiaobin@ybu.edu.cn

electrophysiology, microdialysis and HPLC techniques during MWM test in rats. After that, the DA D1 receptor (D1R) and its key downstream members in DG were examined by immunohistochemistry or Western blot assay. The results showed that the levels of epinephrine and CORT in the serum of the rats in CS group were significantly increased compared with those in the control group ($P < 0.05$). In CS group rats, the escape latency was significantly prolonged and the number of platform crossing was markedly decreased during MWM test, compared with those in control group ($P < 0.05$). Furthermore, the amplitude of fEPSP in the DG was not changed during MWM test in CS rats, while it was significantly increased on the 3rd day of MWM test in control group ($P < 0.05$). Compared with baseline or control group, CS group showed significantly increased DA level from the 1st to 3rd days of MWM test in the DG ($P < 0.05$). In addition, the protein expression of D1R was markedly up-regulated in the DG in CS group, while the protein expression levels of p-PKA, p-CREB and BDNF were significantly reduced, compared with those in control group. These results suggest that CS may impair spatial learning and memory abilities in rats through the enhancement of the DA levels in the hippocampal DG.

Key words: chronic stress; spatial learning and memory; dentate gyrus; dopamine

应激是机体受到内外环境刺激时所出现的全身性非特异性适应反应。应激状态下机体内稳态失衡，引起神经内分泌、免疫、神经生化等一系列改变，影响脑的认知功能 [1, 2]。学习和记忆是一切认知活动的基础，而海马是参与学习和记忆活动的关键脑区，也是对应激最敏感的脑区 [3]。成年哺乳动物海马在学习记忆，尤其空间相关记忆的形成中起关键作用，而海马的各个亚区在空间认知活动中扮演不同角色 [4]。其中，齿状回 (dentate gyrus, DG) 区是新信息进入海马环路的传入点，在空间有关信息的传入、编码和新的空间相关记忆形成中发挥关键作用 [5]。突触效能的长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 是海马实现学习和记忆功能的重要神经生理学基础，而兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP) 的较长时程增强是其主要表现之一 [6]。研究表明慢性应激 (chronic stress, CS) 可以通过影响海马 DG 区 LTP 损害学习和记忆功能 [7]，但其具体神经化学机制尚不完全清楚。

多巴胺 (dopamine, DA) 是中枢神经系统中重要的儿茶酚胺类神经递质，研究表明，海马 DG 区的 DA 可参与调节突触可塑性 (如 LTP) 和空间学习记忆功能 [6, 8]。研究显示，背侧海马内的 DA 主要是由来自蓝斑核 (locus coeruleus, LC) 的神经末梢所释放的 [9]，且 CS 可导致 LC 强烈兴奋 [10]，但是 CS 诱发的空间学习和记忆行为改变是否与海马 DG 区的 DA 有关尚不清楚。本研究通过行为学结合在体生物电记录法、脑部微量透析和高效液相色谱法，动态观察 CS 对学习记忆活动中海马 DG 区突触传递效能和 DA 的影响，并通过分子生物学实验检测可能的分子调节机制，为揭示 CS 通过影响海马 DG 区 DA 损害大鼠的空间学习和记忆活动的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 12 月龄的 Sprague-Dawley (SD) 系雄性大鼠购自延边大学实验动物中心，生产许可证号：SCXK(吉)2017-003。动物在自由进食饮水、自然光照、室温 20~25 °C 条件下饲养。所有动物适应性饲养 7 d 后，随机将实验动物分为对照 (Control) 组和慢性应激 (CS) 组 (各组 $n = 10$)。动物实验方案经延边大学动物伦理委员会批准。

1.2 CS 模型制备及实验步骤 CS 组大鼠接受慢性温和不可预知应激原处理，即每天按照随机数表给予 CS 组大鼠以下多种刺激的一种：束缚 4 h、夹尾 2 min、冰水游泳 5 min、禁食禁水 24 h、悬尾 3 min、水平旋转 15 min、通宵照明 12 h 或倾斜鼠笼 24 h (同种刺激不连续出现)，共刺激 32 d。Control 组大鼠不接受任何刺激。最后一次应激刺激结束后，两组大鼠在 10% 水合氯醛 (300 mg/kg, i.p.) 麻醉下进行头部手术：大鼠固定于脑立体定位仪，根据 Paxinos 和 Watson 的图谱 [11]，将微量透析探针的外套管 (外侧固定着内径为 0.58 mm 的不锈钢钢管) 植入到一侧海马 DG 区上 1.5 mm 的位置 (定位坐标为：AP 3.4 mm；L/R 1.6 mm；H 2.5 mm)，将刺激电极插入与外套管同侧的内嗅皮层穿通纤维 (perforant path, PP) 上 (定位坐标为：AP 6.8~7.0 mm；L/R 4.9 mm；H 4.5~5.0 mm)，并用牙托水泥固定在颅骨上。大鼠分笼饲养恢复 2 d，在异氟烷麻醉下，经外套管将微量透析探针插入到海马 DG 区 (探针下端超出外套管下端 1.5 mm，其尖端覆盖醋酸纤维素膜，可透过分子量小于 50 000 kDa 的物质)，经外套管外固定的钢管将记录电极插入到 DG 区 (插入到对 PP 电刺激出现最大反应的位置)，并用蜡固定，参考电极缠绕在固定于颅骨表面的螺丝上。待

大鼠清醒后进行 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM) 的适应性游泳 2 min，并从第二天开始进行为期 5 d 的 MWM 训练，每次游泳结束后立即进行 DG 区微量透析样本的收集及场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) 的 记录；MWM 训练最后一天的透析样本收集和 fEPSP 记录结束后，动物过量麻醉处死，心脏采血、取脑，进行酶联免疫吸附、免疫组织化学染色和蛋白免疫印迹实验。实验流程如图 1 所示。

1.3 主要试剂 盐酸多巴胺购自美国 SIGMA 公司；大鼠肾上腺素和皮质酮 (corticosterone, CORT) ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司；浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司；兔抗大鼠磷酸化蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 抗体、兔抗大鼠丝氨酸 133 位点磷酸化的 cAMP 反应元件结合蛋白 (cyclic AMP-response element binding protein, CREB) 抗体、兔抗大鼠脑源神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体、兔抗大鼠 β-actin 抗体、兔抗大鼠 DA 的 D1 受体 (D1 receptor, D1R) 抗体、HRP 标记羊抗兔二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司；ECL 显影液购自美国 Millipore 公司。

1.4 MWM 实验 MWM 由圆形水池、圆形站台和视频记录系统组成。实验条件设定为：室温、水温 22 °C，站台固定在第三象限 (目标象限)。实验分为定位航行实验和空间探索实验。其中定位航行实验每天在相同时间段 (8:00~10:00) 进行，共 4 d，记录大鼠从入水到完全爬上水下隐藏站台所用的时间 (即逃避潜伏期)，以此来衡量大鼠海马的空间学习能力。具体训练方法为：每天将每只大鼠头部朝向池壁轻轻从 4 个象限的固定入水点放入，每只大鼠的游泳时限为 120 s，如果大鼠在 120 s 内找到站台并站立其上 10 s，则大鼠的逃避潜伏期记录为找到站台的时间；若大鼠 120 s 内未找到站台，则需将大鼠引导至站台上，站立 10 s，逃避潜伏期记录为 120 s。第 5 天在相同时间段进行空间探索实验，撤去站台，记录大鼠在 120 s 内穿越原站台区的次数，以此来衡量大鼠的空间记忆能力。

1.5 海马 DG 区的 fEPSP 幅值及 DA 含量测定 MWM 游泳结束后，大鼠放入自制代谢笼，连接仪器和各电极、透析探针。通过刺激隔离器 (ISO-Flex, A.M.P.I., Israel) 向 PP 发出 15 次单个方波脉冲电刺激 (0.1 ms/phase，刺激强度为引起最大 fEPSP 反应的 1/2，间隔为 30 s)，诱发的 fEPSP 由 AC 放大器 (Neurolog, Digitimer, UK) 放大并数字化及分析 (Micro3, CED, UK)，计算 15 个 fEPSP 波痕的平均幅值。利用微量泵 (ESP-64, Eicom, Japan) 经微量透析探针向 DG 区灌流 Ringer's 液 (1.5 μL/min)，收集 DG 区透析样品 10 min。将收集的样本注入到生物活性物质微量分析系统 (HTEC-300, Eicom, Japan) 内，以 230 μL/min 的速度通过高效液相色谱分离柱和电化学检测器，测定大鼠 DG 区 DA 的含量。

1.6 酶联免疫吸附实验 心脏采集全血样本，室温静置 1 h 后，4 °C 3 000 r/min 离心 15 min，取上清液，具体方法如下：将血清加入到 96 孔板内，标准孔加入标准品、样本孔内加入样本、其余各孔加入酶结合物各 50 μL，各孔均加入抗体 50 μL，混匀后用不干胶盖板，37 °C 温育后洗涤，并重复三次；各孔分别加入显色剂 A 液和 B 液 50 μL，37 °C 避光孵育后，加入终止液 50 μL，置于酶标仪检测 450 nm 波长处 OD 值。

1.7 免疫组织化学染色实验 冰上取大鼠插入微量透析探针一侧的海马组织，利用免疫组织化学染色法观察 DG 区 D1R 的表达情况。DG 区组织福尔

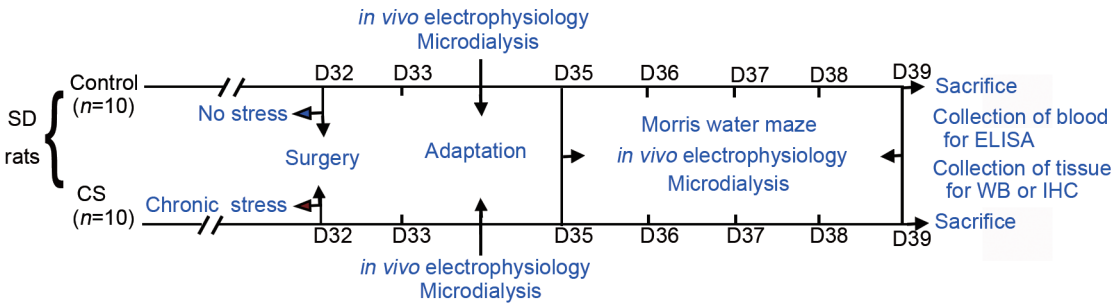

图 1. 实验流程图

Fig. 1. Experimental schedule. D, day; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; WB, Western blot; IHC, immunohistochemistry.

马林固定 12 h 后，石蜡包埋、切片 (厚度为 8 μm)，切片过程中确认探针的尖部是否出现在 DG 区，未见探针痕迹的动物不计入统计。各组大鼠海马切片于二甲苯中脱蜡 20 min，梯度酒精中脱水 5 min，抗原修复 30 min，PBS 冲洗后过氧化物阻断 20 min，缓冲液清洗后 BSA 室温封闭 20 min，滴加抗 D1R 一抗 (1:100)，孵育过夜；第二天 PBS 冲洗后，滴加适当二抗 (1:200)，室温孵育 2 h；PBS 冲洗后加 DAB 显色 10 min，苏木素复染 2 min，酒精梯度浸泡后二甲苯透明，中性树脂封片。

1.8 蛋白免疫印迹实验 冰上取大鼠未插入微量透析探针一侧的海马 DG 区组织，加入配制好的裂解液 (含 PMSF 和蛋白磷酸酶制剂混合物)，充分匀浆后离心取上清液，BSA 法测定蛋白浓度；电泳条件为恒压 90 V，转膜条件为 4 °C，恒压 90 V；5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，PBST 洗 3 次后加入抗 β-actin (1:2 000)、D1R (1:1 000)、p-PKA (1:1 000)、p-CREB^{Ser133} (1:1 000) 和 BDNF 抗体 (1:1 500)，4 °C 孵育过夜，PBST 洗涤，二抗 (1:2 000) 孵育 2 h，ECL 显色，曝光。以 β-actin 为内参蛋白进行蛋白表达的相对定量。

1.9 统计学分析 利用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析，计量资料以 mean ± SD 表示。两样本的均数比较采用独立样本 *t* 检验，多组样本均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验，$P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CS对大鼠血清中应激激素浓度的影响

CS 能够引起应激激素水平上升，本研究通过 ELISA 法检测了主要应激激素，如糖皮质类激素 (啮齿类动物主要是 CORT) 和肾上腺素水平的变化。结果显示，与 Control 组相比，CS 组大鼠血清中肾上腺素和 CORT 的浓度显著升高 (均 $P < 0.05$)(表 1)，提示 CS 模型制备成功。

2.2 CS对大鼠空间学习和记忆能力的影响

本研究通过 MWM 实验评估大鼠的空间学习和记忆能力。定位航行实验结果显示，两组大鼠的逃避潜伏期均随着训练天数的增加而逐渐下降 (均 $P < 0.05$)，提示空间学习的过程；但在 4 d 的 MWM

表1. 慢性应激对大鼠血清中肾上腺素和皮质酮浓度的影响

Table 1. Effects of chronic stress (CS) on the concentrations of epinephrine and corticosterone (CORT) in serum of rats

Group	Epinephrine (μg/L)	CORT (μg/L)
Control	66.63 ± 9.86	28.77 ± 2.12
CS	250.36 ± 36.84*	59.81 ± 6.10*

Mean ± SD, $n = 10$. *$P < 0.05$ *vs* Control group.

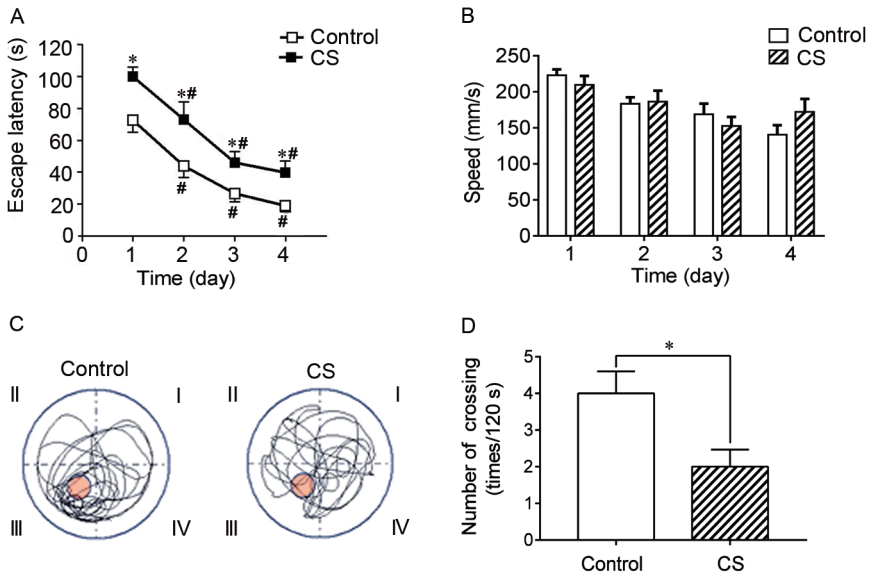

图 2. 慢性应激(CS)对大鼠的空间学习和记忆能力的影响

Fig. 2. Effects of chronic stress (CS) on the spatial learning and memory abilities in rats. *A*, *B*: The escape latency (*A*) and swimming speed (*B*) in place navigation trial of MWM test. *C*, *D*: Representative swimming traces (*C*) and the number of platform crossing (*D*) in spatial probe trial of MWM test. The escape platform location is indicated by a small red circle in the left lower quadrant of water maze outline. Data are mean ± SD, $n = 10$. *$P < 0.05$ *vs* Control group, #$P < 0.05$ *vs* 1st day.

训练过程中，CS 组大鼠的逃避潜伏期均明显长于 Control 组 (均为 $P < 0.05$，图 2*A*)，而两组大鼠每天的游泳速度之间无明显差异 (图 2*B*)，提示 CS 损伤了大鼠的空间学习能力。MWM 训练第 5 天的空间探索实验结果显示，与 Control 组比较，CS 组大鼠在目标象限的游泳轨迹明显稀疏 (图 2*C*)，而且穿越原站台区的次数也明显减少 ($P < 0.05$，图 2*D*)，提示 CS 损伤大鼠的空间记忆能力。

2.3 CS对海马DG区突触传递效能和DA含量的影响

本研究在大鼠每天游泳结束后测定了海马 DG 区 fEPSP 幅值和细胞外液中的 DA 含量，并以开始 MWM 训练前 (适应性游泳后测得) 的基础值为 100%，计算出每天训练后的变化率。两组大鼠的 DG 区 DA 含量基础值分别为 (0.36 ± 0.15) pg/μL (Control 组) 和 (0.30 ± 0.11) pg/μL (CS 组)，两组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。如图 3 所示，在为期 5 d 的 MWM 训练过程中，Control 组大鼠海马 DG 区的 fEPSP 幅值和 DA 水平均出现先增加后下降的趋势，训练第 3 天与基础值相比有显著性差异 ($P < 0.05$)，提示 DA 可能参与空间学习相关 LTP 的形成中；与之相比，在空间学习过程中，CS 组大鼠海马 DG 区的 fEPSP 幅值与基础值相比无明显变化，但 DA 的增加反应却明显增强，表现为在训练的第 1、2、3 天 DA 含量显著增高，与基础值及 Control 组相比均有显著差异 (均为 $P < 0.05$)。

2.4 CS对DG区D1R及其下游信号通路关键蛋白表达的影响

前期研究 [8] 显示，DG 区的 DA 通过 D1R 参与海马的空间学习记忆活动的调节，因此，本研究采用免疫组织化学染色观察了 CS 对 DG 区的 D1R 表达的影响，如图 4*A* 所示，D1R 在 CS 大鼠海马 DG 区的表达明显上调。蛋白免疫印迹法检测结果也显示，与 Control 组比较，CS 大鼠海马 DG 区 D1R 总蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$，图 4*B*)。

PKA/CREB/BDNF 信号通路是 D1R 下游参与调节认知相关行为的关键途径。本研究结果显示，与 Control 组相比，CS 大鼠海马中 p-PKA、p-CREB 和 BDNF 的蛋白表达水平均显著下调 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

应激普遍存在于社会生活中，应激状态下，机体出现以蓝斑 - 交感 - 肾上腺髓质系统和下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质系统的强烈兴奋为主的一系列神经内分泌反应，从而导致糖皮质激素 (啮齿类动物主要是 CORT) 和肾上腺素水平显著上升 [10, 12]。海马神经元表达大量的糖皮质激素受体，极易受到应激的影响。而 CS 对啮齿类动物海马的学习和记忆功能的影响与应激种类和应激对象等多种因素有关。但总体来说，CS 对雄性大鼠的海马依赖性学习和记忆有明显的损伤作用，例如，维持 21 d 的束缚应激或者 30 d 的噪声应激使大鼠在 MWM、八臂迷宫、新物体识别和 Y 迷宫等行为测试中均表现出学习记忆能力的损伤 [13, 14]。本研究结果也显示，给予 12 月龄的雄性大鼠 32 d 的 CS，引起大鼠的空间学习和记忆功能损伤。如前所述，LTP 是海马实现

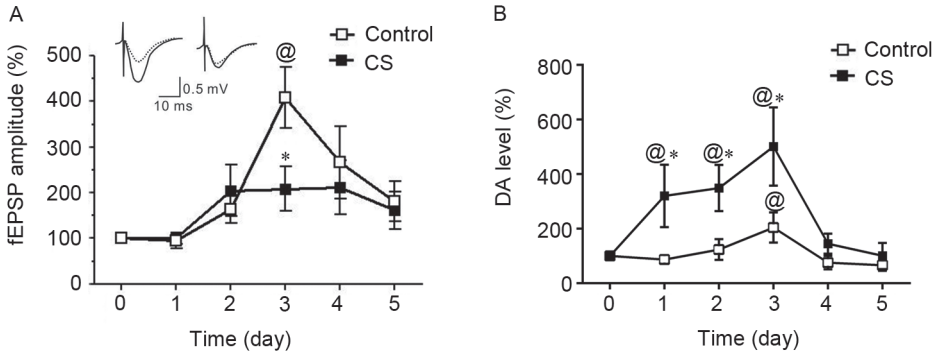

图 3. 慢性应激(CS)对MWM训练过程中海马DG区突触传递效能和DA水平的影响

Fig. 3. Effects of chronic stress (CS) on fEPSP amplitude (*A*) and DA level (*B*) in the hippocampal DG during MWM test. Inset: dotted line, basal level; solid line, 3rd day of MWM test (left: Control; right: CS). fEPSP amplitude and DA level are expressed as percentages of values obtained before starting training (basal level). Data are mean ± SD, $n = 10$. $^{*}P < 0.05$ *vs* Control group; $^{@}P < 0.05$ *vs* basal level (0 d).

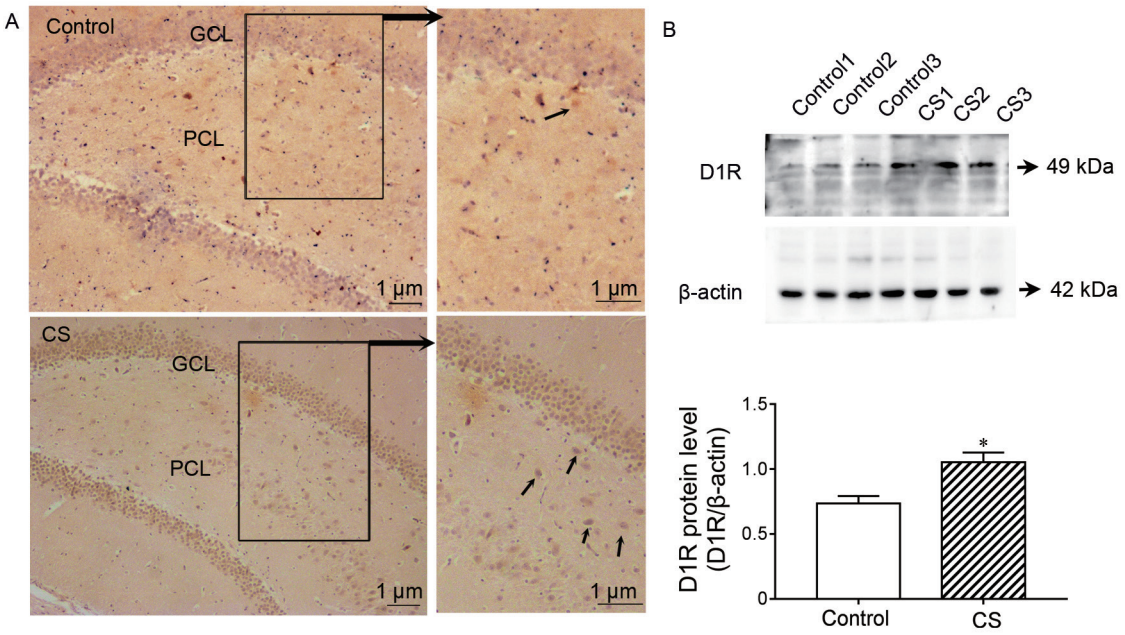

图 4. 慢性应激(CS)对海马DG区D1R表达的影响

Fig. 4. Effects of chronic stress (CS) on the expression of D1R in the hippocampal DG. *A*: Representative images of immunohistochemical staining. Scale bar, 1 μm. Arrows denote representative positive-stained cells. GCL: granule cell layer; PCL: polymorphic cell layer. *B*: Result of Western blot assay. Data are mean ± SD, $n = 3$. $^{*}P < 0.05$ *vs* Control group.

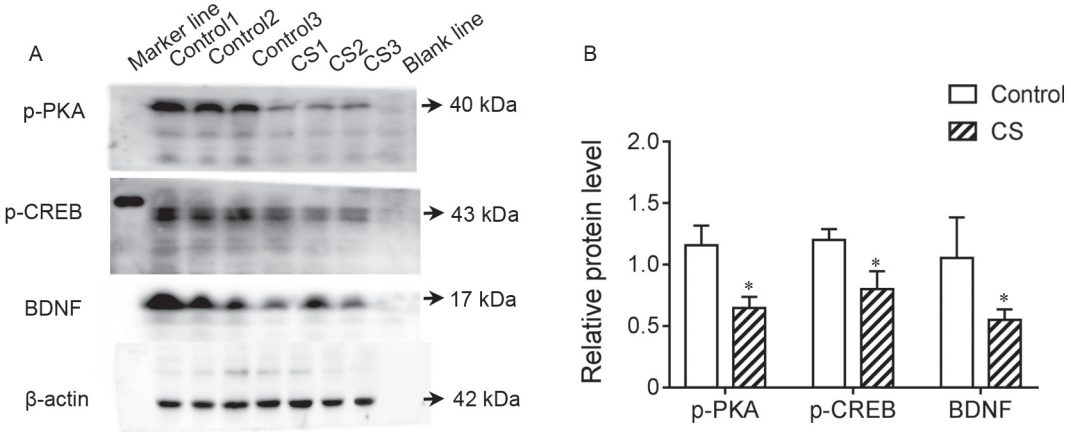

图 5. 慢性应激(CS)对海马DG区p-PKA、p-CREB和BDNF蛋白表达的影响

Fig. 5. Effects of chronic stress (CS) on the expression of p-PKA, p-CREB and BDNF in the hippocampal DG detected by Western blot. Data are mean ± SD, $n = 3$. $^{*}P < 0.05$ *vs* Control group.

学习和记忆活动的神经生理学基础，多数研究以较长时间的 EPSP 增强为指标研究学习记忆行为相关的 LTP 现象 [15, 16]。本研究结果显示，Control 组大鼠海马 DG 区 fEPSP 幅值在 MWM 训练过程中先逐渐增加而后降低，而 CS 组大鼠 DG 区的 fEPSP 幅值在 MWM 训练过程中未出现显著改变，提示空间学习活动中可能在大鼠海马 DG 区出现学习相关 LTP，而 CS 可能通过抑制这种突触传递效能损伤大鼠的空间学习和记忆能力。

DA 是中枢神经系统重要的神经递质，也可作为神经调质参与调节海马 LTP 和空间学习记忆活动 [6, 17]。本研究组先前的研究 [8] 和本研究结果显示，在 MWM 训练过程中，大鼠海马 DG 区的 DA 水平呈现先增加后下降的变化趋势，而这一变化与 DG

区谷氨酸水平以及 fEPSP 幅值变化基本对应，提示海马 DG 区的 DA 可能通过调节突触传递效能参与调节正常大鼠的空间学习和记忆过程。海马内的 DA 主要来自 LC 的神经末梢释放 [9, 18]，而应激可引起 LC 结构和功能的相应变化，增强其对外界环境刺激的应答性 [19]。本研究结果显示，CS 虽未引起海马 DG 区 DA 基础水平的改变，却明显增强了其在空间学习过程中的增加反应，提示 CS 可能增强了 DG 区 DA 对空间信息传入的应答。研究表明，DA 对认知活动及相关突触可塑性的调节与其精准的释放水平相关，过多或过少的 DA 均可对认知活动产生负面影响 [20]，例如，过量 DA 会诱发神经毒作用并损伤突触应答反应等 [21–23]。因此我们推测，CS 损伤大鼠的空间学习和记忆及其相关 LTP 可能与 CS 引起的 DG 区 DA 在空间学习过程中的异常增多有关。

海马内 DA 对学习记忆活动及突触可塑性的调节作用主要通过其 D1R 实现 [6, 9, 24]，而 PKA 是 D1R 下游促进海马空间认知活动的关键因子之一：正常情况下，经 D1R/Gs/cAMP 途径磷酸化的 PKA 可促进下游的 CREB 133 位点丝氨酸残基的磷酸化，进而上调下游靶蛋白 BDNF 表达，易化学习记忆及海马 LTP [25–27]。中枢神经系统中的 DA 及其 D1R 对认知功能及突触传递效能的调节作用呈现“倒 U”型效应，即 DA 水平或 D1R 活动过低或过强都会损害认知行为及突触传递效应 [23]。例如，在前额叶皮质 D1R 的过强刺激导致工作记忆的损伤 [28]，在纹状体、丘脑、海马等切片中，高浓度的 DA 或 D1R 激动剂可抑制 NMDA 受体介导的兴奋性突触后电流 [29] 等。目前认为，过强刺激 DA-D1R 系统抑制突触传递效应的可能机制是，高浓度 DA 通过磷酸化神经元内多巴胺和 cAMP 调节的磷蛋白 (dopamine and adenosine 3’,5’-monophosphate-regulated phosphoprotein, DARPP)-32 的 Thr-75 位点抑制 D1R/PKA 信号传递过程 [23, 30]。除此之外，高浓度 DA 或 D1R 激动剂可作用于突触前 D1R 抑制突触前膜的谷氨酸分泌，或通过促进 D1R 与 NMDA 受体 NR-1 亚基的结合直接减少 NMDA 受体的活性，进而抑制突触传递 [23, 31]。本研究结果也显示，在 CS 大鼠海马 DG 区 DA 水平和 D1R 表达明显增多，而其下游的 p-PKA、p-CREB 以及 BDNF 的表达均显著下降。根据以上研究报道及本研究结果，我们推测 CS 大鼠海马 DG 中增加的 DA 可能通过磷酸化 DARPP-32 的 Thr-75 位点抑制 D1R/PKA 信号途径，或通过直接或间接抑制 NMDA 受体的活性，进而抑制空间学习及其相关 LTP。

本研究虽然初步证明 CS 可能通过影响海马 DG 区突触传递效能和 DA 水平损伤大鼠的空间学习和记忆功能，但不能排除 CS 通过影响其他神经递质 / 调质及其相应受体下调 PKA/CREB/BDNF 信号传递的可能性，这些可能性及其具体机制需要进一步探讨。

参考文献

1 Chen JR, Wei Z, Han HY, Jin LL, Xu CY, Dong D, Lu JP, Wan GB, Peng ZW. An effect of chronic stress on prospective memory via alteration of resting-state hippocampal subregion functional connectivity. Sci Rep 2019; 9(1): 19698.

2 Tielbeek JJ, Al Itejawi Z, Zijlmans J, Polderman TJ, Buckholtz JW, Popma A. The impact of chronic stress during adolescence on the development of aggressive behavior: A systematic review on the role of the dopaminergic system in rodents. Neurosci Biobehav Rev 2018; 91: 187–197.

3 Mcewen BS. Neurobiological and systemic effects of chronic stress. Chronic Stress (Thousand Oaks) 2017; 1: 247054 7017692328.

4 Kim J, Lee I. Hippocampus is necessary for spatial discrimination using distal cue-configuration. Hippocampus 2011; 21(6): 609–621.

5 Suthana N, Ekstrom A, Moshirvaziri S, Knowlton B, Bookheimer S. Dissociations within human hippocampal subregions during encoding and retrieval of spatial information. Hippocampus 2011; 21(7): 694–701.

6 Trevor JH, Wheatley BM, Sinclair DB, Madeline B, Matthew EL, William FC. Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(42): 18185–18190.

7 Radahmadi M, Hosseini N, Nasimi A. Effect of chronic stress on short and long-term plasticity in dentate gyrus; study of recovery and adaptation. Neuroscience 2014; 280: 121–129.

8 Wang FX, Wan P, Wang WY, Xiao B, Jin H, Jin QH. Dopamine in the hippocampal dentate gyrus modulates spatial learning via D1-like receptors. Brain Res Bull 2019; 114: 101–107.

9 Kempadoo KA, Mosharov EV, Choi SJ, Sulzer D, Kandel ER. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. Proc Natl Acad Sci U S A 2016; 113(51): 14835–14840.

10 Wood CS, Valentino RJ, Wood SK. Individual differences in the locus coeruleus-norepinephrine system: Relevance to

stress-induced cardiovascular vulnerability. Physiol Behav 2017; 172: 40–48.

11 Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th Ed. Academic Press, 2007.

12 Krugers HJ, Zhou M, Joëls M, Kindt M. Regulation of excitatory synapses and fearful memories by stress hormones. Front Behav Neurosci 2011; 5: 62.

13 Luine V, Gomez J, Beck K, Bowman R. Sex differences in chronic stress effects on cognition in rodents. Pharmacol Biochem Behav 2017; 152: 13–19.

14 Cheryl DC. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2010; 34(5): 742–755.

15 Yang K, Broussard JI, Levine AT, Jenson D, Arenkiel BR, Dani JA. Dopamine receptor activity participates in hippocampal synaptic plasticity associated with novel object recognition. Eur J Neurosci 2017; 45(1): 138–146.

16 Lv J, Zhan SY, Li GX, Wang D, Li YS, Jin QH. α1-Adrenoceptors in the hippocampal dentate gyrus involved in learning-dependent long-term potentiation during active-avoidance learning in rats. Neuroreport 2016; 27(16): 1211–1216.

17 Yadollah RS, Zeinab F. Dopamine and noradrenaline in the brain; overlapping or dissociate functions? Front Mol Neurosci 2020; 12: 334.

18 Tomonori T, Adrian JD, Alex S, Patrick AS, Miwako Y, Masahiko W, Caroline CS, Guillén F, Karl D, Robert WG, Richard GM. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. Nature 2016; 537(7620): 357–362.

19 Olga B, Neal J, Daniel C. Persistent stress-induced neuroplastic changes in the locus coeruleus/norepinephrine system. Neural Plast 2018; 2018: 1892570.

20 Grogan J, Bogacz R, Tsivos D, Whone A, Coulthard E. Dopamine and consolidation of episodic memory: Timing is everything. J Cogn Neurosci 2015; 27(10): 2035–2050.

21 Masoud ST, Vecchio LM, Bergeron Y, Hossain MM, Nguyen LT, Bermejo MK, Kile B, Sotnikova TD, Siesser WB, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG, Richardson JR, Miller GW, Ramsey AJ, Cyr M, Salahpour A. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and L-DOPA reversible motor deficits. Neurobiol Dis 2015; 74: 66–75.

22 Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. Neuron 2009; 62(2): 218–229.

23 Jeremy KS, Charles RY. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. Prog Neurobiol 2004; 74(1): 1–58.

24 Vassilios P, Stylianos K, Costas P. Effects of endogenous and exogenous D1/D5 dopamine receptor activation on LTP in ventral and dorsal CA1 hippocampal synapses. Synapse 2018;72(8): e22033.

25 Zhang JB, Ko SY, Liao YL, Kwona Y, Jeon SJ, Sohn A, Cheong JH, Kim DH, Ryu JH. Activation of the dopamine D1 receptor can extend long-term spatial memory persistence via PKA signaling in mice. Neurobiol Learn Mem 2018; 155: 568–577.

26 Kaldun J, Spreche S. Initiated by CREB: resolving gene regulatory programs in learning and memory switch in cofactors and transcription regulators between memory consolidation and maintenance network. BioEssays 2019; 41(8): 1900045.

27 Bambah D, Travaglia A, Chen DY, Pollonini G, Alberini CM. A positive autoregulatory BDNF feedback loop via C/EBPβ mediates hippocampal memory consolidation. J Neurosci 2014; 34(37): 12547–12559.

28 Goldman RPS, Muly EC, Williams GV. D_1 receptors in prefrontal cells and circuits. Brain Res Rev 2000; 31(2–3): 295–301.

29 Castro NG, Mello MC, Mello FG, Aracava Y. Direct inhibition of the *N*-methyl-*D*-aspartate receptor channel by dopamine and (+)-SKF38393. Br J Pharmacol 1999; 126(8): 1847–1855.

30 Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Huganir RL, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. Nature 2000; 402(6762): 669–671.

31 Salter MW. D1 and NMDA receptors hook up: expanding on an emerging theme. Trends Neurosci 2003; 26(5): 235–237.