

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

神經傳遞物質與實驗性水腦症之關係（於不同年齡之麻醉與 自由行走之實驗性水腦動物的研究）

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC90-2314-B-002-430-

執行期間：90年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：郭夢菲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 28 日

中文摘要

關鍵詞：鼠、水腦症、自由行走、紋狀體、多巴胺、微透析、HPLC、DOPAC、HVA

水腦症是小兒神經外科最常見的疾病，其造成之腦部功能障礙有的可以藉由腦脊髓液分流術（CSF diversion）來改善，因此一般學者認為水腦症造成之腦部功能障礙可能主要源於神經元之「功能」障礙（functional disturbances），而不只是腦部「結構」之破壞所造成的，因為後者引起的神經功能障礙往往是不易恢復的。過去的研究也證實水腦症發生時會活化腦部某些神經傳遞物系統。

本計劃使用一個文獻上常用之動物水腦模型來研究「急性與慢性水腦症以及CSF diversion對於實驗性水腦動物腦部神經傳遞物質多巴胺（dopamine）系統之影響」。本計劃使用微透析（microdialysis）技術來*in vivo*「連續」監測紋狀體內dopamine及其代謝產物DOPAC及homovanillic acid（HVA）之胞外濃度；因為使用微透析技術可以改善過去實驗的缺點，亦即必需犧牲實驗動物而只能測得一個時間點之組織濃度。使用微透析技術可以在同一隻實驗動物產生水腦前、後與CSF diversion前、後得到立即且連續之結果而不必犧牲實驗動物。

本實驗室研究發現急性水腦時DA之組織濃度大量增加而其代謝產物則減少；而DA之胞外濃度變化不大，其代謝產物卻減少。在接受CSF diversion後，DA之胞外濃度升高，DOPAC及HVA之胞外濃度則下降。而慢性水腦症之變化則較不明顯。

藉由本實驗之進行我們希望可以進一步瞭解水腦症對紋狀體多巴胺系統之影響，以提供臨床治療水腦症之時機與治療效果之參考。未來我們還可以應用此方法研究水腦症與其他神經傳遞物質之相關性。我們認為水腦症引起的腦部損傷除了導因於CSF之機械性壓迫及缺血外，腦部代謝性之異常改變也扮演一個相當重要的角色，包括神經傳遞物質之改變與酵素MAO活性之改變。在進行CSF diversion後的前二小時神經傳遞物質之改變便可得到緩解（presynaptic membrane之活性）；而在六小時dopamine之代謝（酵素MAO的活性）可以獲得改善。

英文摘要

Keywords: Rat; Freely moving; Hydrocephalus; Dopamine; Striatum; Microdialysis; HPLC ; DOPAC; HVA

Hydrocephalus is the most common disease in pediatric neurosurgery. It happens to the old patients, too. The motor and/or behavioral disturbances induced by hydrocephalus are, in some cases, rapidly reversible by CSF diversioning procedure suggesting that there may be a functional impairment of neurons.

Neonatal hydrocephalus is induced in 3-week old rat by kaolin injection into the cisterna magna. Striatal extracellular concentrations of the dopamine and its metabolites in rats, DOPAC and homovanillic acid (HVA), are assayed by microdialysis and HPLC, 1 and 4 weeks after induction of hydrocephalus (acute and chronic hydrocephalus, respectively). The assays are also conducted in the hydrocephalic rat brains with CSF diversion. The tissue concentrations of dopamine, DOPAC and HVA will be measured by HPLC in various groups of animal. The data will be compared with the control and sham-operated groups.

We test the hypothesis that CSF accumulation during hydrocephalus will have effects from mechanical compression, vascular compromise and metabolic disturbance on the striatum, which is located adjacent to the ventricular system. Dopaminergic system, one of the major neurotransmitter systems in the striatum, will be affected during hydrocephalus. The changes of the dopaminergic system during acute and chronic hydrocephalus may be reversed differently after the CSF diversion. After that, the hypothesis that the age of the animal might respond differently to the effect of hydrocephalus will be tested.

In the first year of this project, we are going to use neonatal rats to study the relationship between the dopaminergic system and hydrocephalus. In the second year, freely moving rats are going to be used in stead of anesthetized rats to get a chronological profile of the dopaminergic system during the development of hydrocephalus. The changes of the dopaminergic system after CSF diversion will be studied in the freely moving rats, too. In the final year, the changes of dopaminergic system after hydrocephalus in aged rat brains will be studied. The results will be compared with the changes in the immature rat brain, which are shown in the first two years of this project.

前言

水腦症的特徵是由於腦脊髓液 (cerebrospinal fluid, CSF) 分泌過多、CSF 通路受阻、或吸收不良而造成腦室變大。水腦症會造成腦室旁之白質及大腦皮質之病理變化。上述病理變化除了導因於CSF之機械性壓迫及缺血外，腦部代謝性之異常也可能是一個重要之原因 (Del Bigio & Vriend, 1998; Engelsen et al., 1985; Garelis et al., 1974; Kawano et al., 1980)。

罹患水腦症之患者不乏出現巴金森氏症症狀之情形 (Curran & Lang, 1994)。多數患者在接受CSF分流術 (CSF diversion) 後，症狀可獲得改善；有的患者則留下運動與認知障礙。因此學者認為水腦症極可能是藉由CSF不正常之堆積於腦

室而傷及側腦室旁之紋狀體所致。因此學者嘗試用kaolin溶液或silicon oil注射在動物之cisterna magna內引發動物水腦症，或使用有專利之「患有先天水腦症」之鼠類來進行腦部神經傳遞物質，包括dopamine (DA) 及其他單胺之研究 (Ehara et al., 1982; Higashi et al., 1986; Lovely et al., 1989; Miwa et al., 1982; Miyaki et al., 1991 & 1992; Owman et al., 1971)

Del Bigio等人 (Del Bigio et al., 1998) 以注射silicon oil引發成兔水腦之動物模型，來測量腦內15個部位之單胺組織濃度的變化。他們發現在下視丘及髓部之DA之濃度會下降，而單胺之代謝產物則在腦部有普遍上升之情形。

Tashiro與Drake (Tashiro & Drake, 1998) 以成鼠之水腦模型研究水腦後tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons (TH-immunoreactive neurons, 即DA neurons) 之數目變化，他們發現水腦會造成ventral tegmental area (VTA) TH-immunoreactive neurons之數目明顯減少；而在水腦後2週施予CSF分流術則這些神經元之數目會被保留下來，幾乎與對照組無異；然而延遲分流CSF之時機(如在水腦發生4週後，屬於慢性水腦)，則無法保存這些DA TH-immunoreactive neurons之數目。Tashiro等人 (Tashiro et al., 1997) 並發現鼠腦發生水腦時其neostriatum之cholinergic與GABAergic neurons之數目隨腦室增大而減少，而substantia nigra compacta之DA neurons之數目亦減少，而推測可能因基底核部位結構與功能之受損而可以引起水腦病患運動障礙及智力/情緒之異常。

Otsubo等人 (Otsubo et al., 1997) 發現在患「先天性水腦症」之鼠腦，如果在12-14天大時接受CSF引流手術可以使紋狀體內原本降低之DA濃度回升，而螢光組織等研究亦有相同之發現。

Miyake等人 (Miyake et al., 1992) 發現在注射kaolin溶液引發之鼠腦水腦症者其腦部catecholamine之濃度並未增加或減少，然而在注射tyrosine-hydroxylase之抑制劑——alpha-methyl-p-tyrosine (250mg/kg) 後，對照組與水腦組之catecholamine濃度都有下降且水腦組比對照組明顯下降許多，因此他們認為DA neurons之活性在水腦時是降低的。

綜合上述的研究可以發現在水腦發生時DA neurons之數目會減少且活性會降低，紋狀體內DA之組織濃度可能降低或不變；而單胺之代謝產物則普遍上升。早期解決水腦之問題，可以改善上述DA系統之變化。然而上述實驗都是測量腦部單胺之組織濃度，或以免疫生化組織染色來研究細胞數變化，皆需要犧牲動物才可測得，也因此其DA系統之變化，只局限於某個時間點，而非一連續性之變化。

本研究使用一個文獻上常用之新生動物水腦模型來研究「神經傳遞物質與實驗性水腦症之關係」。不同的是本計劃率先使用微透析 (microdialysis) 技術來「連續」監測紋狀體內dopamine (DA) 及其代謝產物3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 之胞外濃度在急性與慢性水腦症產生後以及CSF diversion前後之改變，以及組織濃度在水腦時的變化。使用微透析技術可以改善過去的實驗

必需犧牲實驗動物而只能測得一個時間點之組織濃度的缺點，使用微透析技術並且可以在CSF diversion前、後得到立即且連續之結果而不必犧牲實驗動物。

研究目的

1. 本計劃研究一個神經外科最常見之疾病——水腦症的致病機轉。
2. 以動物之水腦模式研究水腦症與neurotransmitter——dopamine系統之關係。
3. 瞭解水腦症導致腦部急性及慢性損傷之機轉。
4. 瞭解水腦症之外科治療為何有效之機轉與其有時有極限的因素。

文獻探討 (References)

1. Berry M.D., Juorio A.V., Paterson I.A.: The functional role of monoamine oxidases A and B in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 42:375-391, 1994.
2. Curran T., Lang A.E.: Parkinsonian syndromes associated with hydrocephalus: case reports, a review of the literature, and pathophysiological hypothesis. *Mov. Disord* 9:508-520, 1994.
3. Del Bigio M.R., Bruni J.E., Vriend J.P.: Monoamine neurotransmitters and their metabolites in the mature rabbit brain following induction of hydrocephalus. *Neurochem. Res.* 23:1379-86, 1998.
4. Del Bigio M.R., Vriend J.P.: Monoamine neurotransmitters and amino acids in the cerebrum and striatum of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res.* 798:119-126, 1998.
5. Ehara K., Tanaka C., Tamaki N., Matsumoto S.: Changes in the hypothalamic and brainstem catecholaminergic systems in experimental hydrocephalus: a histochemical observation, in: Matsumoto S., Tamaki N. (Eds.), *hydrocephalus: Pathogenesis and Treatment*, Springer, Tokyo, pp. 75-87, 1991.
6. Engelsen B.A., Fosse V.M., Myrseth E., Fonnum F.: Elevated concentrations of glutamate and aspartate in human ventricular cerebrospinal fluid (vCSF) during episodes of increased CSF pressure and clinical signs of impaired brain circulation. *Neuroscience Letters* 62:97-102, 1985.
7. Garelis E., Young S.N., Lal S., Sourkes T.L.: Monoamine metabolites in lumbar CSF: the question of their origin in relation to clinical studies. *Brain Res.* 79:1-8, 1974.
8. Gray E.G., Whittaker V.P.: The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* 96:79-87, 1962.

9. Higashi K., Asahisa H., Ueda N., Kobayashi K., Hara K., Noda Y.: Cerebral blood flow and metabolism in experimental hydrocephalus. *Neurolog. Res.* 8:169-76, 1986.
10. Jones H.C., Harris N.G., Rocca J.R., Anderson R.W.: Progressive changes in cortical metabolites at three stages of infantile hydrocephalus studies by in vitro NMR spectroscopy. *J. Neurotrauma* 14:587-602, 1997.
11. Kawano T., Tsujimura M., Mori K., Eujita Y.: Changes in ventricular dopamine and homovanillic acid concentrations in hydrocephalic patients. *Neurologia Medico-Chirurgica.* 20:373-8, 1980.
12. Krajl M.: A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 14:1683-1685, 1965.
13. Lakshmana M.K., Shankaranarayana Rao B.S., Dhingra N.K., et al.: Role of monoamine oxidase type A and B on the dopamine metabolism in discrete regions of the primate brain. *Neurochem. Res.* 23:1031-1037, 1998.
14. Lovely T.J., McAllister J.P. 2d., Miller D.W., Lamperti A.A., Wolfson B.J.: Effects of hydrocephalus and surgical decompression on cortical norepinephrine levels in neonatal cats. *Neurosurgery.* 24:43-52, 1989.
15. Miwa S.: The regional differences of catecholaminergic neuron systems in experimental hydrocephalus of rabbits. *Nippon Geka Hokan - Archiv fur Japanische Chirurgie* 51:70-8, 1982.
16. Miwa S., Inagaki C., Fujiwara M., Takaori S.: The activities of noradrenergic and dopaminergic neuron systems in experimental hydrocephalus. *J. Neurosurg.* 57:67-73, 1982.
17. Miyake H., Eghwudjakpor P.O., Sakamoto T., Kurisaka M., Mori K.: Neurotransmitter changes in hydrocephalus: effects of cerebral metabolic activator on kaolin-induced hydrocephalus, in: Matsumoto S., Tamaki N. (Eds.), *Hydrocephalus: Pathogenesis and Treatment*, Springer, Tokyo, pp. 68-74, 1991.
18. Miyake H., Eghwudjakpor P.O., Sakamoto T., Mori K.: Catecholamine alterations in experimental hydrocephalus. *Childs Nerv. Syst.* 8:243-6, 1992.
19. Naoi M., Nagatsu T.: Inhibition of monoamine oxidase by 3,4-dihydroxyphenylserine. *J. Neurochem.* 47: 604-607, 1986.
20. Otsubo Y., Ito H., Shibuya T.: Intracerebral monoamine concentration after ventriculoperitoneal shunting in the congenital hydrocephalus rat. *Neurologia Medico-Chirurgica.* 37:669-76, 1997.
21. Owman C., Rosengren E., West K.A.: Influence of various intracranial pressure levels on the concentration of certain arylethylamines in rabbit brain. *Experientia* 27:1036-1037, 1971.
22. Raevskii K.S.: Functional role and pharmacological regulation of the dopaminergic

system of the brain. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk 8:19-24,1998.

23. Tashiro Y., Drake J.M.: Reversibility of functionally injured neurotransmitter systems with shunt placement in hydrocephalic rats: implications for intellectual impairment in hydrocephalus. Journal of Neurosurgery. 88:709-17, 1998.
24. Tashiro Y., Drake J.M., Chakraborty S., Hattori T.: Functional injury of cholinergic, GABAergic and dopaminergic systems in the basal ganglia of adult rat with kaolin-induced hydrocephalus. Brain Research. 770:45-52, 1997.
25. Wood M.D., Wyllie.: The rapid preparation of synaptosomes, using a vertical rotor. J. Neurochem. 37: 795-797, 1981.
26. Wu K.D., Chen Y.M., Chu J.S., Hung K.Y., Hsieh T.S., Hsieh B.S.: Zona fasciculata-like cells determine the response of plasma aldosterone to metoclopramide and aldosterone synthase mRNA level in aldosterone-producing adenoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80: 783-789, 1995.
27. Wu K.D., Chen Y.M., Chu T.S., Chueh S.C., Wu M.S., Hsieh B.S.: Expression and localization of the human dopamine D2 and D4 Receptors mRNA in the adrenal gland, aldosterone-producing adenoma, and pheochromocytoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86(9):4460-7, 2001.

研究方法 (Subjects and Methods)

1. 實驗動物部份：

將實驗動物（3週大，3w/o rats）分為四組，每組各10隻。第一組為control group；第二組為sham-operated group，接受0.06ml sterile saline注射入cisterna magna；第三組為acute hydrocephalus group，接受0.06ml sterile 25% kaolin溶液注射入cisterna magna，一週後進行下一步實驗；第四組為acute hydrocephalus with CSF diversion；第五組為chronic hydrocephalus group，接受0.06ml sterile 25% kaolin溶液注射入cisterna magna，四週後進行下一步實驗；第六組為chronic hydrocephalus with CSF diversion。

Cisterna magna injection：rats以腹腔內注射8% chloral hydrate溶液（0.5cc/100mg）麻醉，在顱頸交界處以碘酒消毒，並在顯微鏡之指引下以無菌kaolin溶液注入cisterna magna，造成水腦症或sham-operation。一般約在注射後一週會產生急性水腦症，在注射後四週會產生慢性水腦症。未產生水腦之動物則由實驗中去除，此外約有40%之實驗動物因水腦提前死亡。

2. 微透析探針之操作與CSF diversion：

不同組之動物在預定之時間（如：acute hydrocephalus group在注射kaolin溶液一週後；chronic hydrocephalus group在注射kaolin溶液四週後）以立體定位方

式將 microdialysis 探針置入左側紋狀體內。Rats 先以 8% chloral hydrate (0.5cc/100mg) 麻醉，以立體定位儀固定頭部，在頭部中線作一直線切口，將頭皮向兩側掀開，在顱骨上鑽兩個小洞。左側小洞距中線 2.7mm，由冠狀縫向前 1mm，供 microdialysis 探針置入紋狀體之用，插入深度為 6.4mm。確切深度再根據 microdialysis 之收集液的 HPLC 變化加以微調。右側小洞距中線 2.0mm，由冠狀縫向後 1mm，供腦室穿刺引流腦脊髓液之用，差入深度為 3-4mm。左側 microdialysis 接上林格氏液以 1 μ m/min 之速度連續注入，且每 10 分鐘以收集瓶收集一次紋狀體內胞外液，並以低溫暫時貯存，儘快以 HPLC 測量其 dopamine & DOPAC 之濃度。第四、六組 (acute and chronic hydrocephalus with CSF diversion) 在置入 microdialysis 探針一小時後，將腦室引流導管置入右側腦室，先量引流前腦壓 (以鼠耳之外耳道為零點)，再開始引流並維持腦壓在 5 cmH₂O 左右 (正常腦壓)，此時 microdialysis 探針仍繼續每 10 分鐘收集一次紋狀體胞外液，至水腦減壓後 2 小時為止，其他組別則每 10 分鐘收集一次紋狀體胞外液共 2 小時。實驗結束，以飽和之 KCl 溶液心內注射將實驗動物犧牲。

3. 急性水腦症與慢性水腦症紋狀體內 dopamine 與 DOPAC 組織濃度之變化：

另取不同組之動物各 10 隻，在預定之時間以飽和之 KCl 溶液心內注射將實驗動物犧牲。實驗動物斷頭後，迅速將頭取下，在頭上分離出紋狀體，稱重，置入微離心管；加入 0.1N, 10 μ g/mg 腦重之 perchloric acid，以超音波振盪器磨勻並以 900g 離心 5 分鐘。取 50 μ l 上層清液用 HPLC 測量單胺類濃度。

4. HPLC：

將 5 μ l 收集之微透析灌流液或取自腦部紋狀體之組織萃取液注射入 HPLC 機器，測量 dopamine 與 DOPAC 之胞外濃度。本實驗使用 HPLC 含有一個 5C-18 Bondapak reverse phase column (Bechman) 接在一個電化學電極 (Bioanalytic System, West Lafayette, IN) Dopamine 及 DOPAC 用一個 glassy carbon 工作電極 (設定在 +0.741V vs. Ag/AgCl) 測量，並用一個 external standard 來量化。其 mobile phase 含 1.8g 之 heptanesulfonic acid, 4.4ml triethylamine, 2.5ml 85% phosphoric acid, 0.1g Na EDTA, 50ml acetonitrile per one liter。

結果 (Results)

*p<0.05

1. Acute hydrocephalus:

a. Extracellular levels of dopamine, and DOPAC detected by microdialysis (pmol/ml of dialysate):

	DA*	DOPAC
Acute control	10.06	700.23

Acute hydrocephalus	10.47	458.20
---------------------	-------	--------

b. Tissue levels of dopamine and DOPAC of acute hydrocephalus and acute control groups (pmol/mg of tissue):

	DA	DOPAC*
Acute control	13.41	6.56
Acute hydrocephalus	19.88	4.26

c. The changes of dopamine and DOPAC after CSF diversion during acute hydrocephalus (% of baseline):

	20 min	40min	60 min	80min	100min	120min
DA	104.65*	134.29	128.80	141.38*	121.57	142.67*
DOPAC	80.74*	73.79*	79.98*	71.01*	80.50	75.29*

2. Chronic hydrocephalus:

a. Extracellular levels of dopamine and DOPAC detected by microdialysis (pmol/ml of dialysate):

	DA	DOPAC
Chronic control	13.37	671.04
Chronic hydrocephalus	11.34	620.52

b. Tissue levels of dopamine and DOPAC (pmol/mg of tissue):

	DA	DOPAC
Chronic control	15.57	7.92
Chronic hydrocephalus	16.02	6.69

c. The changes of dopamine, DOPAC and HVA after CSF diversion during chronic hydrocephalus (% of baseline):

	20 min	40min	60 min	80min	100min	120min
DA	90.21	91.72	101.32	88.83	94.99	88.99
DOPAC	105.11	108.93	106.26	96.82	106.57	111.35

討論 (Discussion)

我們的研究發現急性水腦時DA之組織濃度大量增加而其代謝產物則減少；而DA之胞外濃度變化不大，其代謝產物卻減少。在接受CSF diversion後，DA之胞外濃度升高，DOPAC及HVA之胞外濃度則下降。而慢性水腦症之變化則較不明顯。與文獻報告相呼應的是，水腦症引起的腦部損傷除了導因於CSF之機械性壓迫及缺血外，腦部代謝性之異常改變的確扮演一個相當重要的角色。因為水腦症引發的腦部損傷如果完全以CSF之機械性壓迫及缺血為主，其造成之神經傳遞

物質之改變應為DA及其代謝產物因滯留而同步上升；而在CSF diversion後因腦壓減低、滯留減少而應同步降低。我們的初步研究結果顯示在水腦症時，DA neurons之活性降低，presynaptic membrane之活性亦降低，因此造成DA之組織濃度大量增加而沒有引起胞外DA濃度大幅度之改變，而DA之代謝產物的組織濃度減少可能肇因於MAO之活性降低。在水腦獲得釋放後，DA及其代謝產物之釋放漸趨正常，使得DA大量釋放於胞外造成胞外濃度升高；而DOPAC之釋放雖也有增加，卻被因腦壓降低而獲得改善的腦血流大量帶走而使其胞外濃度相對地下降。因此，水腦症所引發腦部代謝性之異常改變十分重要，值得進一步研究。

計劃成果自評（研究內容與原計劃相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值）

本計劃原來設計為三年計劃，研究包括：

第一年、The changes of dopaminergic system in immature rat brain with kaolin-induced hydrocephalus before and after CSF diversion

第二年、The changes of dopaminergic system in freely moving immature rats with kaolin-induced hydrocephalus

第三年、The effect of aging on the dopaminergic system in various ages of rat with kaolin-induced hydrocephalus

由於計劃經費只通過一年，對於 freely moving rats 之水腦變化（較符合生理狀況）與老化之水腦型態與病態生理變化無法一窺全貌實為可惜。一年的研究結果顯示在 immature brain，水腦症所引發腦部代謝性之異常改變在急性水腦可獲得立即改善，慢性水腦則否，與臨床經驗相同。我們除了在臨床治療病患需更細心早期偵測、早期積極治療水腦症外，對於已產生不可逆變化的慢性水腦症，如何在改善機械性壓迫後進一步改善腦部代謝性的變化，值得進一步思考與研究。