

# 不同时期温和应激对大鼠海马神经元、T 淋巴细胞亚群的动态影响

王一赫<sup>1</sup>, 江虹<sup>1</sup>, 李颖<sup>2</sup>, 潘芳<sup>1</sup>, 刘德祥<sup>1</sup>

(1. 山东大学医学院, 济南 250012; 2. 中国人民公安大学, 北京 100038)

**【摘要】** 目的: 探讨不同时期温和应激对大鼠海马神经元、外周血 T 淋巴细胞亚群的影响。方法: 采用温和应激刺激建立不同应激时期动物模型, 以血清皮质醇和旷场行为作为应激状态的指标, 观察不同时期温和应激对大鼠海马神经元形态、外周血 T 淋巴细胞亚群的动态影响。结果: 温和应激第 7 天, 海马神经元肿胀、淡染、排列稀疏; 应激第 14 天, 细胞萎缩, 间隙增大, 细胞层次变稀、中断; 应激第 21 天, 出现大量细胞坏死。外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数在应激 7 天组、14 天组和 21 天组显著低于对照组。CD4/CD8<sup>+</sup> 比率在应激 7 天组、14 天组显著低于对照组。T 淋巴细胞亚群的变化趋势为 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数和 CD4/CD8<sup>+</sup> 比率均在应激 7 天降低, 应激 14 天时为最低水平, 应激 21 天回升。旷场行为在应激 7 天、应激 14 天、应激 21 天均显著高于对照组, 其中应激 14 天旷场运动得分最高。血清皮质醇水平在应激 7 天组和 14 天组显著高于对照组, 应激 21 天时回落。结论: 温和应激 7 天导致海马神经元损伤、细胞免疫功能抑制和稳态失衡, 明显紊乱出现在应激 14 天, 持续至应激 21 天。外周血 T 淋巴细胞亚群可作为应激的指标之一。

**【关键词】** 应激; 海马; T 淋巴细胞亚群; 行为; 免疫功能

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2013)05-0731-04

## The Dynamic Effects of Different Duration of Mild Stress on Hippocampal Neurons and T Lymphocyte Subsets

WANG Yi-he, JIANG Hong, LI Ying, PAN Fang, LIU De-xiang

School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China

**【Abstract】 Objective:** To explore the dynamic changes of hippocampal neurons morphology, and T lymphocyte subsets exposed to different duration of mild stress. **Methods:** Using mild stress to build different duration of stress animal model, morphological changes of hippocampal neurons, the T lymphocyte subsets in blood were measured, while serum cortisol level and the behaviors in open field test were measured as the stress level. **Results:** After exposed to mild stress, cell swell and hypochromatic, cell shrunk and intercellular spaces appeared on the 7th day, neurons degeneration was observed on the 14th day, and neuronal necrosis on the 21th day in hippocampus. The numbers of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets in the 7, 14, 21 days stressed groups were lower than control group, and 14 days stressed group had the least numbers of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets among three stressed groups. CD4/CD8<sup>+</sup> ratio was remarkably lower in 7 days and 14 days stressed groups than control group, and the 14 days stressed group had the lowest level of CD4/CD8<sup>+</sup> ratio. The total movements of open field test in 7, 14 and 21 days stressed group were higher than those in control group. The levels of serum cortisol were higher in 7 and 14 days stressed groups and dropped in 21 days stressed group. **Conclusion:** 7 days mild stress induces neurons damage in hippocampus. Meanwhile, the mild stress decreases the function of T lymphocyte subsets and induces imbalance of cellular immunity function, the obvious changes of which appear on the 14th stressed day. Blood T lymphocyte subsets could be used as biomarkers of stress.

**【Key words】** Stress; Hippocampus; T lymphocyte subsets; Behavior; Immunity function

研究提示, 外周血淋巴细胞数目和比例代表机体淋巴细胞分布和免疫系统的激活状态。一般来说, CD3<sup>+</sup>细胞代表机体总的细胞免疫功能, CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞降低提示细胞免疫功能低下或受抑制, CD4/CD8<sup>+</sup> 比值改变反映免疫稳态失衡<sup>[1]</sup>。最近的研究提示, 应激导致的免疫紊乱在心理障碍发生中扮

演重要角色<sup>[2]</sup>。应激致免疫激活产生的细胞因子与心理障碍相关的递质代谢、神经内分泌活动、神经可塑性变化密切相关<sup>[3,4]</sup>。抑郁障碍患者存在淋巴细胞增生反应降低和淋巴细胞亚群数目改变<sup>[5,6]</sup>。提示淋巴细胞亚群在应激致病中发挥一定的作用。

个体在现实生活中遭遇多种形式的温和应激, 如长期独居、工作压力、存在慢性疾病等。与突如其来的重大应激不同, 这类应激源虽然相对温和、机体

**【基金项目】** 山东省自然科学基金(ZR2011CM015)

通讯作者: 刘德祥

对其有一定的适应能力,但长期存在也会引发心理、生理紊乱<sup>[7]</sup>。但温和应激与 T 淋巴细胞亚群功能的关系尚需进行全面和深入的研究。

下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴是应激反应的基本通路,应激使下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴激活,肾上腺皮质激素分泌。因海马富含皮质激素受体,应激性皮质激素水平升高导致海马兴奋性毒性,引发神经细胞坏死和凋亡。海马又是参与记忆和情绪功能的重要脑结构,应激致海马损伤时会出现心理、行为紊乱的症状<sup>[8]</sup>。因此,海马形态和功能改变可作为应激性损伤的敏感指标。

本研究通过建立不同时程温和应激动物模型,观察不同时程的温和应激对海马神经元形态、血清皮质醇、旷场行为和外周血 T 淋巴细胞亚群的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 32 只(购自山东大学实验动物中心),体重 200g 左右,2.5 月龄。分笼饲养于安静舒适环境(3-4 只/笼),室温  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ 。自由饮水,标准饲料喂养,自然节律光照(8:00am~8:00pm)。实验前适应环境 4 天,然后随机分为 4 组:对照组、应激 7 天组、应激 14 天组、应激 21 天组,每组 8 只。

### 1.2 应激实验程序

建立温和应激动物模型:实验大鼠接受不同时程的温和应激刺激,包括电击足底(30V,5 秒钟)、夹尾 1 分钟、禁食 24 小时、禁水 24 小时、昼夜颠倒 24 小时、 $4^{\circ}\text{C}$  冰水游泳 5 分钟、振荡 30 分钟、噪音刺激 1 小时、热应激等 9 种刺激随机安排,每日一种。每种刺激出现 2-3 次,同种刺激不能连续出现使动物不能预料刺激的发生<sup>[9]</sup>。对照组不给予任何刺激。

### 1.3 旷场试验

木制箱  $90\times 90\times 45\text{cm}$ ,底部划分成  $5\times 5$  的方格,实验时,将大鼠置于旷场实验装置底面中央格中,记录其 3min 内的活动情况。以大鼠所越过格子数目(以三爪或三爪以上同时进入一个格子内为准)为水平得分,后肢站立次数为垂直得分,二者总和为旷场试验总得分<sup>[10]</sup>。每只大鼠测试完毕后,彻底清洁旷场再进行下一只大鼠的行为实验。

### 1.4 血清皮质醇检测

行为学测试结束后,动物行腹腔麻醉(乌拉坦,  $0.4\text{ml}/100\text{g}$ ),用普通注射器经心脏抽血 4ml,离心取血清,用放射性免疫法测定血清皮质醇含量。

### 1.5 T 淋巴细胞亚群测定

用装有肝素的注射器经心脏抽血 4ml 左右,抗凝血标本经淋巴细胞分离液分层离心。在初步分离的淋巴细胞中加入 10 倍容积 0.56%KCl, $37^{\circ}\text{C}$  10 分钟以溶解红细胞。再离心后将细胞沉淀用生理盐水制成细胞悬液。涂片,室温风扇吹干后,用 SABC 法测定 T 淋巴细胞亚群。

### 1.6 海马神经元形态检测

实验动物采集完血标本后用 10% 水合氯醛 ( $100\text{mg}/\text{kg}$ ) 经腹腔注射深度麻醉后,迅速开胸暴露心脏,经升主动脉插管,剪开右心房。先用 100ml 冷生理盐水( $4^{\circ}\text{C}$ )冲洗血液(压力为  $100\sim 200\text{mmHg}$ ),随后用新鲜配置的 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 ( $4^{\circ}\text{C}$ , pH7.4) 500ml,以先快后慢的原则灌注固定 30 分钟,然后开颅取脑,根据大鼠脑立体定位图谱,取含海马结构的组织(冠状断面),厚约 2mm,浸入 4% 甲醛磷酸缓冲液保存。经脱水、透明、浸蜡、铸块常规制成石蜡块,由切片机切成  $5\mu\text{m}$  厚冠状石蜡切片,作 H-E 染色,光镜下观察海马 CA3 和 DG 区细胞形态。

### 1.7 主要试剂及仪器

淋巴细胞分离液;Triton-X-100 (Sigma 公司);SABC 试剂盒(武汉博士德公司),包括兔抗大鼠 CD3、CD4、CD8 一抗、生物素化山羊抗兔 IgG、链霉亲和素-碱性磷酸酶(SABC-AP)、BCIP/NBT 显色剂、水溶性封片剂、中性核快红等;皮质醇放射免疫试剂盒(武汉博士德生物工程公司);旷场实验箱(深圳瑞沃德公司)。

### 1.8 统计分析

数据以均数 $\pm$ 标准差呈现,采用 one-way ANOVA, LSD-*t* 分析数据,以  $P<0.05$  做为具有统计显著性的标准。

## 2 结 果

### 2.1 T 淋巴细胞亚群数和 CD4/CD8+比率的变化

CD3+、CD4+T 淋巴细胞数在应激 7 天、14 天、21 天组均显著低于对照组。动态分析显示,CD3+、CD4+T 淋巴细胞数在应激 14 天组显著低于应激 7 天组;应激 21 天组显著高于应激 14 天组。不同时程应激组 CD8+T 淋巴细胞与对照组相比均无显著性差异。

CD4/CD8+比率在应激 7 天、14 天组显著低于对照组。动态分析显示,CD4/CD8+比率在应激 14 天组显著低于应激 7 天组,应激 21 天组显著高于应激 14 天组。

T 淋巴细胞亚群数和 CD4/CD8+比率的变化趋

势是在应激 7 天降低,应激 14 天为最低水平,应激 21 天回升。结果见表 1。

表 1 不同应激时程 T 淋巴细胞亚群的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

指标	对照组	应激7天组	应激14天组	应激21天组
CD3+	71.21±1.96	54.84±2.38**	52.02±3.20** <sup>△△</sup>	63.22±3.46** <sup>##</sup>
CD4+	44.20±1.15	24.84±2.56**	20.77±1.33** <sup>△△</sup>	38.22±4.30** <sup>##</sup>
CD8+	27.44±1.12	31.22±0.67	31.23±1.88	27.02±1.88
CD4/CD8+	1.57±0.08	0.84±0.09**	0.67±0.03** <sup>△△</sup>	1.44±0.18**

注:\*\* $P<0.01$  与对照组比较;<sup>△△</sup> $P<0.01$  与应激 7 天组比较;<sup>##</sup> $P<0.01$  与应激 14 天组比较(one-way ANOVA, LSD- $t$  检验),下同。

## 2.2 海马神经元形态变化

对照组大鼠海马神经元形态正常,核仁清晰可见,细胞边缘清晰,细胞排列整齐、层次紧密。应激 7 天组,细胞体积肿胀、细胞淡染、细胞排列稀疏;应激 14 天组,细胞萎缩,细胞间隙增大,细胞层次变稀、中断;应激 21 天组,细胞形态不规则,细胞数量减

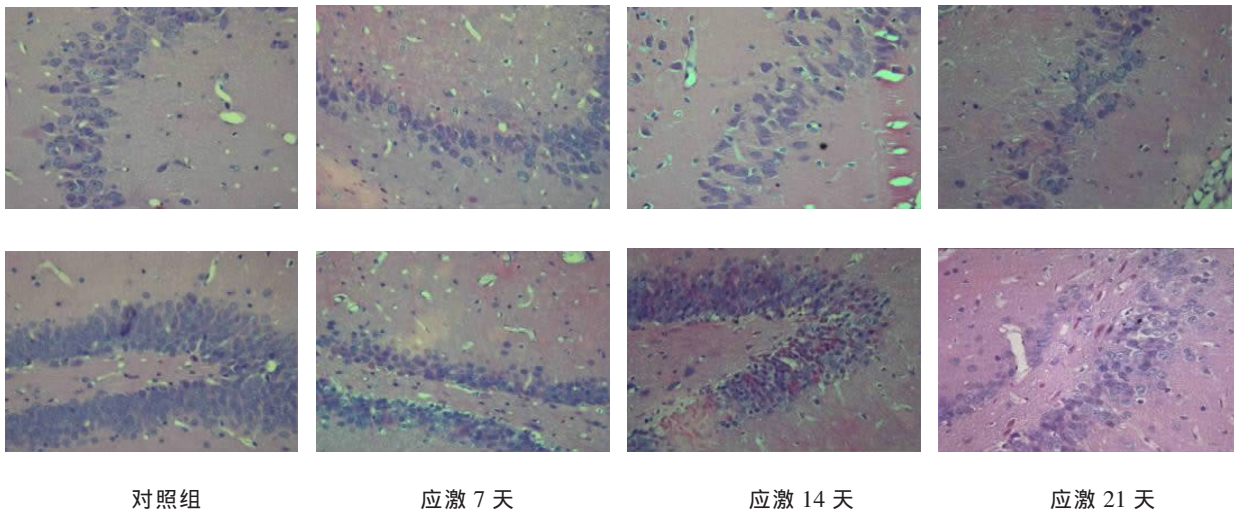
少,排列疏松不齐,大量细胞坏死,出现细胞核固缩、破裂现象。见附图。

## 2.3 旷场行为变化

水平运动得分:应激 14 天组显著高于对照组。垂直运动得分:应激 14 天、21 天组显著高于对照组。旷场试验总分:应激 7 天、14 天和 21 天组显著高于对照组。不同应激时程旷场试验水平得分、垂直得分和总分的变化趋势为应激 7 天时升高,应激 14 天时最高,应激 21 天时开始恢复。见表 2。

## 2.4 血清皮质醇的变化

血清皮质醇在应激 7 天组和 14 天组显著高于对照组。其变化趋势是应激 7 天明显升高,14 天维持在最高水平,应激 21 天回落。应激 21 天组皮质醇水平与对照组相比无显著性差异。见表 3。



附图 大鼠海马神经元形态变化(HE 染色,1×400;上图为 CA3 区,下图为 DG 区)

表 2 不同应激时程旷场试验得分比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

指标	对照组	应激7天组	应激14天组	应激21天组
水平得分	41.40±15.26	48.13±11.06	63.80±12.23**	52.20±11.30
垂直得分	4.80±3.35	15.20±8.81	24.00±8.46** <sup>△△</sup>	18.20±4.32**
总分	46.20±16.99	60.80±23.67**	88.20±19.07** <sup>△△</sup>	71.40±13.28**

表 3 不同应激时程血清皮质醇比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

指标	对照组	应激7天组	应激14天组	应激21天组
皮质醇(ng/ml)	3.80±0.83	7.34±2.32**	7.44±2.37**	4.85±1.67 <sup>△△</sup> **

## 3 讨 论

本研究发现,温和应激持续 7 天即可导致机体出现损伤性改变,表现为海马神经元形态异常、血清皮质醇升高和焦虑样行为。同时出现外周血 T 淋巴细胞亚群功能改变。

以往对应激与疾病关系的研究中,多采用疾病模型的应激源如束缚应激、早年分离或长期慢性温

和应激<sup>[11,12]</sup>,而较少关注温和应激的早期阶段对机体机能的影响。本研究观察了温和应激 7 天、14 天和 21 天时中枢和外周应激指标的变化,发现温和应激 7 天海马神经元即出现坏死性改变,持续至 21 天。外周指标中,血清皮质醇在应激 7 天出现明显升高,维持高水平至应激 14 天,在应激 21 天时回落至与对照组相比无显著性差异。旷场行为的变化趋势与血清皮质醇相似,但紊乱持续至应激 21 天仍未恢复到对照组水平。如前所述,海马是应激损伤最敏感的部位,也是应激性认知和情绪紊乱的主要脑结构。应激导致下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴和蓝斑-交感-肾上腺髓质激活<sup>[13]</sup>,皮质醇和儿茶酚胺分泌增多,出现血清皮质醇升高和焦虑样行为。本研究除证实了以往的结论,还提示,临床实践中应关注温和应激对个体的早期影响,及时进行干预。



以往有研究提示,急性或重复应激抑制外周血淋巴细胞有丝分裂原增殖反应、导致免疫细胞在组织间的再分布,使外周血淋巴细胞数目减少,细胞免疫功能降低,诱发免疫紊乱性疾病<sup>[14,15]</sup>。慢性应激时,免疫功能随应激时间进展有不同的变化,多表现为免疫功能先受到抑制而后又提高<sup>[16,17]</sup>,其原因是免疫功能经历激活-紊乱-恢复稳态的过程<sup>[18,19]</sup>。在此过程中,机体机能处在紊乱状态,对疾病的易感性增加<sup>[12,20]</sup>。人类在现实生活中常面临温和性应激源,这类应激源使人产生心理困扰,影响健康状况<sup>[13]</sup>。因此,探讨这类应激源对机体的影响更有意义。本研究发现,温和应激影响外周血T淋巴细胞亚群功能,表现为应激7天代表免疫功能的CD3+、CD4+T淋巴细胞明显降低,应激14天时达到最低点,在应激21天时出现回升趋势,但仍低于正常水平。代表细胞免疫失衡的CD4/CD8+比值有相同的变化趋势。这一结果提示,应激早期(7天)细胞免疫功能低下或受抑制,出现稳态失衡现象。应激14天时,机体的免疫内稳态最为紊乱。提示T淋巴细胞亚群对温和应激敏感,可作为应激反应的指标之一。CD+8T淋巴细胞在应激各时间点的变化不明显。这一现象说明,在T淋巴细胞亚群中,不同的细胞对应激的反应性和调节过程存在差别,其意义还需进一步研究。

#### 参 考 文 献

- 1 Lysle DT, Lyte M, Fowler H. Shock-Induced modulation of lymphocyte reactivity suppression, habituation, and recovery. *Life Science*, 1987, 41(15): 1805-1814
- 2 Garcia R. Stress, synaptic plasticity, and psychopathology. *Reviews in the Neurosciences*, 2002, 13(3): 195-208
- 3 Elenkov IJ. Neurohormonal-cytokine interactions: Implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochemistry International*, 2008, 52(1-2): 40-51
- 4 Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications. *Annals of the New York Academy Science*, 2001, 933(3): 222-234
- 5 Hamer M, Stepton A. Association between physical fitness, parasympathetic control, and proinflammatory responses to mental stress. *Psychosomatic Medicine*, 2007, 69(7): 660-666
- 6 Angela JG, Joseph F, Terry GB, et al. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiology and Behavior*, 2005, 84(5): 697-706
- 7 Van Raaij MT, Oortgiesen M, Timmerman HH, et al. Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiology and Behavior*, 1996, 60(6): 1527-1533
- 8 蒋湘玲,陈旺生,郭敏. 首发抑郁症患者海马容积与磁共振波普的研究. *中国临床心理学杂志*, 2011, 19(4): 430-432
- 9 Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology(Berl)*, 1987, 93(3): 358-364
- 10 Swiergiel AH, Dunn AJ. Effects of interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol. Biochem Behav*, 2007, 86 (4): 651-659
- 11 Sutanto W, De Kloet ER. The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Lab Animals*, 1994, 28(4): 151-169
- 12 刘娜,梁执群,李治国,等. 慢性应激对 2 型糖尿病模型大鼠血清 IL-2、IL-4 和 IL-18 表达的影响. *中国临床心理学杂志*, 2012, 20(1): 35-36
- 13 陆邵佳,李凌江. 神经肽 Y 系统与应激和抑郁症的相关研究进展. *中国临床心理学杂志*, 2012, 20(3): 312-314, 319
- 14 Engler H, Bailey MT, Engler A, et al. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *J Neuroimmunol*, 2004, 148(1-2): 106-115
- 15 Glover DA, Steele AC, Stuber ML, et al. Preliminary evidence for lymphocyte distribution differences at rest and after acute psychological stress in PTSD-symptomatic women. *Brain Behav Immun*, 2005, 19(3): 243-251
- 16 Jessop JJ, Gale K, Bayer BM. Enhancement of rat lymphocyte proliferation after prolonged exposure to stress. *J Neuroimmunol*, 1987, 16(2): 261-271
- 17 Monjan AA, Collector MI. Stress-induced modulation of the immune response. *Science*, 1997, 196(4287): 307-308
- 18 Bauer ME, Perks P, Lightman SL, et al. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiology and Behavior*, 2001, 73(4): 525-532
- 19 Maes M, Van Bockstaele DR, Gastel A, et al. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: Evidence of immune activation. *Neuropsychobiology*, 1999, 39(1): 1-9
- 20 McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, et al. The role of adrenocorticoids as modulation of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interacts. *Brain Research Review*, 1997, 23(1-2): 79-133

(收稿日期:2013-04-20)