

慢性应激对不同月龄大鼠前额叶皮质、纹状体脑源性神经营养因子表达的影响

王一赫¹, 江虹¹, 冀永娟², 李颖³, 樊淑娟¹, 潘芳¹, 刘德祥¹

(1.山东大学医学院, 山东 济南 250012; 2.青岛妇幼医院, 山东 青岛 266011; 3.中国人民公安大学, 北京 100038)

【摘要】 目的:观察慢性应激对不同月龄大鼠行为、前额叶皮质、纹状体脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。方法:采用慢性轻度不可预知性应激建立动物模型,观察 2 月龄和 15 月龄 48 只 Wistar 大鼠的行为学、前额叶皮层和纹状体细胞形态学及 BDNF 的表达。结果:与对照组相比,青年应激大鼠水平运动、直立次数均明显减少,这一变化在老年应激组更明显。应激组糖水偏爱百分比显著低于对照组,并持续到应激结束后一周;老年应激组的糖水偏爱百分比低于青年组。应激组前额叶皮层和纹状体神经细胞呈程度不同的损伤现象,且老年应激组的损伤较青年组严重。应激组前额叶皮质和纹状体 BDNF 表达明显下调,老年应激组下调明显。应激后一周,青年应激组 BDNF 表达有一定程度的升高,但仍显著低于对照组。结论:慢性轻度不可预知性应激引起老年大鼠明显的行为学改变,提示老年大鼠对应激的反应性和耐受性降低。应激导致前额叶皮层和纹状体细胞的变性、萎缩和死亡及 BDNF 表达下降,这一变化在老年组更为明显。

【关键词】 应激; 衰老; 前额叶; 纹状体; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2012)06-0765-04

Chronic Stress Effects on BDNF Expression in PFC and Caudate Putamen in Different Aged Rats

WANG Yi-he, JIANG Hong, JI Yong-juan, LI Ying, et al

School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China

【Abstract】 Objective: To study the chronic stress effects on the behavior and BDNF expression in PFC and caudate putamen in different aged rats. **Methods:** Chronic unpredictable mild stress (CUMS) was used to build 2 month and 15 month old Wistar rats depressive animal model, and to observe the behavior in open field test, sucrose preference, morphologic changes and BDNF expression in PFC and caudate putamen. **Results:** Compared with the control groups, the young stress groups displayed less square crossing and vertical movement, and the aged stress animals had more remarkable changes in those behavior. The young stress rats showed obviously decreased tendency in sucrose preference compared with the control groups. Meanwhile, the aged stress group exhibited obvious decreases of sucrose preference after stress, and persisted 1 week after stress than the young stress group. The young stress groups displayed obviously morphologic damage in PFC and caudate putamen, the aged stress group showed more cell atrophy and cellular necrosis compared with the young stress group. The young stress rats had significant lower BDNF expression in PFC and caudate putamen than the control groups; the aged stress rats showed even lower BDNF expression than the young stress rats at every testing time. **Conclusion:** CUMS induces aged rats to more serious abnormal behavior than young animals, indicating aging is one of the important influence factors in stress. The aged rats have more serious cell atrophy and cellular necrosis than the young rats under CUMS. Stress induces significant reduction of BDNF expression in PFC and caudate putamen. The aged stress rats have much lower BDNF expression than the young rats.

【Key words】 Stress; Age; Prefrontal cortex; Caudate putamen; BDNF

大量研究证实,长期慢性应激加速衰老过程,诱发多系统疾患^[1,2]。其机制是慢性应激可激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA),使糖皮质激素分泌过多,导致海马的兴奋性毒性,引发认知和情绪紊乱^[3-5]。除此之外,有研

究显示,抑郁症患者和慢性应激抑郁模型动物脑内还存在边缘系统-皮质-纹状体-苍白球-丘脑环路结构或功能改变,引发情绪、行为和认知紊乱^[6,7]。其损伤机制除 HPA 轴功能异常以外,还可能与包括以脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)为主的神经营养素的表达下调,使保护作用降低、神经细胞可塑性下降有关^[8,9]。如有研

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2011CM015)

通讯作者:刘德祥

究提示,慢性应激可导致大鼠海马 BDNF 表达显著降低,Smith 等发现束缚应激可明显下调大鼠海马齿状回和 CA3 区 BDNF mRNA 的表达。幼年期母爱剥夺的大鼠,在成年后其海马的 BDNF 水平降低。在脑缺血再灌注损伤及帕金森病等动物模型中发现皮层和纹状体区 BDNF 的水平明显下调^[10,11]。但慢性应激对衰老大鼠前额叶皮质、纹状体脑源性神经营养因子表达的影响研究尚不够深入。本研究通过建立慢性轻度不可预知性应激模型,观察不同月龄大鼠的行为学、前额叶皮质和纹状体形态学和 BDNF 的表达的变化。

1 对象与方法

1.1 实验动物

2 月龄及 15 月龄健康 Wistar 大鼠,体重分别为 200g 及 500g 左右。由山东大学实验动物中心提供,合格证号(SCXK 鲁 20030004)。每笼喂养 5 只大鼠(平均每只大鼠的活动面积为 0.023m²)。控制室温(20±3℃),节律光照(8:00am~8:00pm),标准饲料喂养。喂养一周后对每只动物做旷场实验,各年龄组选择得分相近的大鼠共 48 只。

1.2 应激动物模型的建立

采用慢性轻度不可预知性应激制备应激动物模型^[12,13]:给动物施加电击足底(30 伏,5 秒)、夹尾 1 分钟、禁食 24 小时、禁水 24 小时、昼夜颠倒 24 小时、4℃冰水游泳 5 分钟、振荡 30 分钟及噪音刺激 1 小时等 8 种刺激,每天 1 种,随机出现,持续 21 天。

1.3 行为学指标测定

1.3.1 旷场实验 (Open field test, OF) 用于反映探究活动及情绪反应。采用 90cm×90cm×45cm 的木质旷场实验箱,底部划分为 15cm×15cm 的方格,沿箱壁的方格称为外周格,其余为中央格。实验于 8am~12am 之间在安静的房间内进行。将动物放在正中央格,观察 5 分钟内的活动情况。观察指标:①方格间穿行次数:三爪以上或 1/2 以上身体跨入邻格的次数(为水平运动得分);②直立次数:两前肢离地 1cm 以上(为垂直运动得分)。彻底清洁旷场后再进行下一只大鼠的行为实验。测试时间为应激前一天,应激结束后当日和应激结束后一周。

1.3.2 糖水偏爱实验^[12] 实验前在安静房间内训练动物适应含糖饮水。每笼同时放置 2 个水瓶,第一个 24 小时两瓶均装有 1%蔗糖水。随后的 24 小时,一个瓶装 1%蔗糖水,一个瓶装纯水。23 小时的禁食禁水后,同时给予每只大鼠事先定量好的两瓶水:一瓶

1%蔗糖水,一瓶纯水。60 分钟后,取走两瓶并称重。计算动物的总液体消耗量、糖水消耗量、纯水消耗量,按公式计算出糖水偏爱百分比(糖水偏爱百分比=糖水消耗量/总液体消耗量×100%)。

1.4 灌注与取材

动物经 10%水合氯醛(100mg/kg)腹腔麻醉,迅速开胸暴露心脏,左心室插管至主动脉,剪开右心耳,先用 150ml 冷生理盐水(4℃)快速灌注冲洗血液,随后用新鲜配置的 4%多聚甲醛磷酸缓冲液(4℃, pH7.4) 500ml 灌注固定 30 分钟,开颅取脑,根据大鼠立体定位图谱,取前脑、纹状体脑组织(冠状断面),每块厚约 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 5μm 厚冠状石蜡切片,分别做 H-E 染色和免疫组化测定(试剂盒由武汉博士德生物制品公司提供)。

1.5 图像分析

用 BI-2000 图像分析软件测量组织细胞中 BDNF 表达的强弱程度。用灰度值和平均光密度二个参数判断。每组大鼠纹状体、前额叶皮层取同部位切片,每张切片的 BDNF 表达区选 5 个不同视野,高倍镜下进行着色细胞图像分析,计算每个高倍视野 BDNF 的平均灰度值、OD 值,进行半定量测量。

2 结果

2.1 旷场实验

应激前各组旷场实验各项指标差异均无统计学意义。应激后即刻和应激后一周,应激组水平跨格数和直立次数明显减少。这一趋势在老年应激组更加明显。结果见表 1,表 2。

表 1 不同月龄大鼠水平运动得分比较(n=8, $\bar{x} \pm s$)

应激时间	青年对照组	青年应激组	老年对照组	老年应激组
应激前	63.48±12.66	62.12±15.43	53.87±13.88	57.23±16.33
应激后即刻	55.12±12.34	27.86±9.41*	49.67±12.43	17.36±4.98**
应激后一周	54.52±12.20	29.12±6.77*	47.52±14.33	18.52±6.67**

注:*P<0.05 与对照组比较, #P<0.05 与青年应激组比较(ANOVA, LSD-t 检验),下同。

表 2 不同月龄大鼠垂直运动得分比较(n=8, $\bar{x} \pm s$)

应激时间	青年对照组	青年应激组	老年对照组	老年应激组
应激前	21.52±7.14	22.35±4.36	18.36±5.34	17.73±4.86
应激后即刻	19.43±5.67	11.52±3.25*	15.65±4.61	7.02±2.41**
应激后一周	18.68±5.19	11.84±3.467*	16.18±5.69	6.73±2.82**

2.2 糖水偏爱实验

各组动物基础糖水偏爱百分比均无显著性差异。应激后即刻和应激后一周,应激组的糖水偏爱百分比显著低于对照组。与青年应激组相比,老年应激组的糖水偏爱百分比降低。结果见表 3。

表 3 糖水偏好实验结果 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

应激时间	青年对照组	青年应激组	老年对照组	老年应激组
应激前	84.32±11.93	80.20±14.63	82.15±19.49	81.23±16.60
应激后即刻	82.34±15.43	53.44±13.53**	80.30±10.63	43.42±8.74**#
应激后一周	80.30±10.63	54.43±12.96**	81.07±11.70	43.80±13.02**#

2.3 前额叶皮层和纹状体细胞形态学改变

对照组前额叶皮层神经细胞形态正常,胞膜完整,核仁清晰,各层锥体细胞排列整齐,可见较长的神经纤维。应激组显示有细胞淡染、萎缩、变性。应激后一周,上述变化未见明显改善。与青年应激组相比,老年应激组的损伤更加严重,淡染细胞数量明显增多。

对照组纹状体内细胞大小较一致,常三五成群,也有少数或大或小的细胞,尾壳核内有许多粗细不均的纤维束穿过,苍白球含较多的梭形或三角形细胞,松散分布。成年组大鼠神经细胞胞体大,胞核清晰,染色较深,神经元数量多,而神经胶质细胞的数量较少,毛细血管丰富。老年组大鼠纹状体中神经胶质细胞的数量较 2 月龄大鼠多,神经细胞染色较淡,胞体较小。应激后,应激组出现细胞淡染、肿胀,多数细胞呈空泡状,可见细胞萎缩、变性,使整个视野的色调变浅。老年应激组大鼠异常细胞的数量较青年应激组为多,毛细血管的数量也显著减少。

表 4 各组大鼠前额叶皮层 BDNF 的表达(OD 值) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组	应激后即刻	应激后一周
青年组	1.07±0.18	0.69±0.17**	0.67±0.16**
老年组	0.99±0.16	0.52±0.15**#	0.51±0.14**#

表 5 各组大鼠纹状体 BDNF 的表达(OD 值) ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	对照组	应激后即刻	应激后一周
青年组	0.96±0.17	0.54±0.08**	0.62±0.15**
老年组	0.94±0.11	0.42±0.10**#	0.47±0.11**#

2.4 前额叶皮层和纹状体 BDNF 表达

对照组前额叶皮层可见大量 BDNF 阳性细胞,主要分布于大脑皮质的第三层和第五层,以第五层为主。纹状体中 BDNF 阳性细胞的表达较皮层中略少,细胞膜及胞浆染色。应激后即刻和应激后一周,应激组大鼠前额叶皮层 BDNF 的含量较对照组明显减少,BDNF 阳性神经元的 OD 值明显下降。老年对照组较青年对照组在纹状体和前额叶皮层 BDNF 的表达无显著性差异。而老年应激组在应激后即刻和一周后 BDNF 表达较青年应激组低,差异具有统计学意义。见表 4、表 5。

3 讨 论

慢性应激可导致大鼠海马、前额叶皮层及纹状

体等部位 BDNF 的表达明显降低^[14,15]。人工合成皮质类固醇可以使海马、纹状体及大脑皮层神经元 BDNF mRNA 表达下降,这提示皮质醇损伤神经元与拮抗 BDNF 的表达有关^[16]。这可能是慢性应激能够引起动物情绪和认知异常、免疫力下降、学习记忆力受损的机理。本实验中,老年对照组大鼠的旷场实验各项指标得分均低于青年对照组,提示伴随机体衰老,大鼠对新环境的好奇心及适应能力逐渐下降,表现出一种淡漠情绪。应激后,与青年组相比,老年组在中央格停留时间延长、跨格数和直立次数明显减少,说明衰老大鼠对慢性应激的敏感性增高,应激损伤更加严重,主要表现在对新环境缺乏探索兴趣,兴奋性及适应能力明显降低。形态学方面,本研究发现,慢性应激可导致纹状体神经细胞数量减少,细胞形态改变以及毛细血管数量的减少,且以老年应激组的损伤最为严重。纹状体是单胺类神经递质含量最丰富的脑区之一,单胺类神经递质包括多巴胺、5-羟色胺、儿茶酚胺以及它们相应的代谢产物,是中枢神经系统重要的神经递质,广泛参与运动、认知和学习与记忆、情感活动、内分泌、睡眠等多种功能的调节。这些特定神经递质的含量过低及其受体功能低下是引起抑郁症的神经生化机制原因^[17-19]。可见,慢性应激可导致纹状体为主脑区神经元损伤,且这种损伤具有年龄依赖性。

BDNF 在中枢神经系统的含量是否会伴随衰老而出现增龄性改变,目前尚存在争议。有研究显示,海马 BDNF 的表达与年龄变化关系不大^[14]。也有研究提示老龄大鼠海马神经元 BDNF mRNA 的表达随增龄而显著降低^[15],记忆力衰退与海马体积和 BDNF 的表达相关^[20]。同时,在针对衰老相关的疾病如早发性痴呆、血管性痴呆、帕金森病及缺血缺氧性脑损伤等的研究中也发现了 BDNF 的下调性变化^[21]。另有研究显示,27 月龄大鼠海马 CA3 区 BDNF 的含量较 3-5 月龄大鼠下降 13.3%^[22]。本实验观察了前额叶皮层和纹状体 BDNF 的表达,结果显示,15 月龄大鼠海马、前额叶皮层及纹状体 BDNF 的含量均较 2 月龄大鼠略有下降,但差异不具有统计学意义。说明大鼠中枢神经系统 BDNF 的表达伴随衰老的不同程度而呈逐渐下降的趋势。在 21 天慢性应激后,与青年组相比,老年大鼠 BDNF 的表达表现出更加显著的下降趋势,在应激结束后一周,在青年应激组 BDNF 表达略有好转的情况下,仍未表现出好转趋势,说明老年大鼠由于 BDNF 的下调性改变,对抗应激的能力减弱,应激造成的损伤也更加严重。这一结论除了

支持应激影响边缘系统-皮质-纹状体-苍白球-丘脑环路这一神经解剖环路的功能并导致相应行为、情绪和认知功能障碍的观点外^[20,23],还提示,应激对这一环路的损伤效应与年龄相关,老年个体因应激敏感性增加和应激保护因子 BDNF 的表达下调更易出现上述功能障碍。

参 考 文 献

- Astin JA, Forsyth K. Psychosocial determinants of health and illness: Integrating mind, body, and spirit. *Adv Mind Body Med*, 2004, 20(4): 14-21
- Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, et al. Exercise and the stress system. *Hormones*, 2005, 4(2): 73-89
- Tafet GE, Bernardini R. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(6): 893-903
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*, 2006, 8(4):367-81
- 鲁燕霞,刘萌,石寿森,等. 不同时程心理应激对支气管哮喘大鼠免疫功能的影响. *中国临床心理学杂志*, 2010, 18(2):146-148
- Sousa N, Lukyanov NV, Madeira MD, et al. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuro Science*, 2000, 97(2): 253-266
- 肖晶,朱雪玲,罗英姿,等. 抑郁症的脑结构异常——结构性核磁共振成像研究. *中国临床心理学杂志*, 2011, 19(5): 589-590
- Smith MA, Makin S, Kvetnasky R, et al. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 1995, 15(3): 1768-1777
- Roceri M, Cirulli F, Pessina C, et al. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry*, 2004, 55(7): 708-714
- Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*, 2004, 35(4): 992-997
- Fernandez-Espejo E. Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol Neurobiol*, 2004, 29 (1): 15-30
- 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
- 许晶,李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价. *中国行为医学杂志*, 2003, 12(1):14-17
- Lapchak PA, Araujo DM, Beck KD, et al. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampal formation of aging rats. *Neurobiol Aging*, 1993, 14(2): 121-126
- Croll SD, Nancy Y, Ronald M, et al. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res*, 1998, 812(1-2): 200-218
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, et al. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 2003, 119(3): 887-897
- Tam SY, Roth RH. Mesoprefrontal dopaminergic neurons: Can tyrosine availability influence their functions?. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53(4): 441-453
- 江雪华,张敏,陆大祥,等. 新生期孤养对成年大鼠行为与 5-羟色胺转运体表达的影响. *中国临床心理学杂志*, 2010, 18(4):411-414
- Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 1965, 122(5): 509-512
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, et al. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J Neurosci*, 2010, 30(15): 5368-5375
- 司银楚,朱培纯. 去脑皮层血管对大鼠前脑大细胞基底核 AchE, ChAT, BDNF, TrkB 及其 mRNA 的影响. *神经解剖学杂志*, 2001, 17(2):161-165
- 赖红,曾亮,赵海花,等. 老龄大鼠海马结构脑源性神经营养因子表达的改变. *解剖学杂志*, 2005, 2(86):673-675
- Bjornebekk A, Mathé AA, Gruber SH, et al. Housing conditions modulate escitalopram effects on antidepressant-like behaviour and brain neurochemistry. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2008, 11(8): 1135-1147

(收稿日期:2012-06-16)

(上接第 812 页)

- Wagner S, Doering B, Helmreich I, et al. A meta-analysis of executive dysfunctions in unipolar major depressive disorder without psychotic symptoms and their changes during antidepressant treatment. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 2011. 281-292
- 陶婷,段小菊,张兴利,汪艳,等. 汶川地震幸存儿童执行功能与创伤后应激症状关系. *中国神经精神疾病杂志*, 2010, 5:261-263
- Carrion VG, Garrett A, Menon V, et al. Posttraumatic stress

symptoms and brain function during a response-inhibition task: An fMRI study in youth. *Depression and Anxiety*, 2008, 25(6): 514-526

- Leskin LP, White PM. Attentional networks reveal executive function deficits in posttraumatic stress disorder. *Neuropsychology*, 2007, 21(3): 275
- Kanagaratnam P, Asbjørnsen AE. Executive deficits in chronic PTSD related to political violence. *Journal of Anxiety Disorders*, 2007, 21(4): 510-525

(收稿日期:2012-03-27)