

# 慢性应激导致大鼠颅脑损伤的磁共振研究

王曼<sup>1</sup>, 谢守付<sup>2</sup>, 金魁和<sup>1</sup>

(1.中国医科大学第一医院精神医学科, 辽宁 沈阳 110001; 2.大连市第七人民医院, 辽宁 大连 116023)

**【摘要】** 目的:探讨慢性应激时大鼠中枢神经元损伤与大脑结构、功能改变之间的关系。方法:30只青年雄性 Wistar 大鼠,体重在 185g~255g 之间,随机分为对照组(C组, n=15)和实验组(T组, n=15)。T组大鼠单只分笼喂养,连续 21 天给予不可预见性综合刺激;C组大鼠分 5 只/笼喂养,不给予任何刺激。第 22 天脑组织取材、切片并进行 TUNEL 染色测定;实验前后分别进行旷场分析、体重测定和头部磁共振检查。结果:实验后的 T 组与 C 组相比:体重减轻( $P<0.05$ );中央格停留时间延长( $P<0.01$ );水平穿越格数减少( $P<0.01$ );直立次数减少( $P<0.01$ );修饰次数减少( $P<0.01$ );粪便粒数增多( $P<0.01$ )。在 T 组及 C 组海马各区均可以观察到细胞核内有棕黄色颗粒的凋亡细胞。慢性应激后 T 组与 C 组比较,凋亡细胞所占比例及凋亡细胞计数明显增加,两组有显著性差异( $P<0.01$ )。无论与 C 组还是与实验前本组相比,实验后 T 组大鼠的侧脑室宽度显著增大,中脑导直径显著增大( $P$ 值均 $<0.01$ )。结论:慢性不可预见性综合应激明显增加了大鼠海马各亚区神经元凋亡的数量,并使其头部的 MR 图像表现为脑萎缩。

**【关键词】** 应激; 海马; 凋亡; 磁共振

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2010)03-0278-03

## MR Study of the Brain in Rats with Chronic Unpredicted Comprehensive Stress

WANG Man, XIE Shou-fu, JIN Kui-he

Department of Psychiatry, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

**【Abstract】 Objective:** To study the relationship between the damage of the central neuron and the brain structure and function of the rats with chronic stress. **Methods:** Male Wistar rats (n=30) weighting about 185-255g were divided into the test group (T, n=15) and the control group (C, n=15) randomly. The rats in group T were exposed to various types of stresses every day for consecutive 21 days. The rats in group C did not receive any stress during 21 days. Every rat was weighed, open-field tested and measured for the brain by MR before the test and on the 22nd day. Also, on the 22nd day, the brains were removed and cut coronally. The apoptosis was detected by techniques of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL). **Results:** Weight and the result of Open-field test: compared with group C, group T showed less weight, increased stopping time in the center, decreasing rearing and grooming and increased defecation after 21-day stress ( $P<0.01-0.05$ ). Compared with group C, the percentage of positive cells in the hippocampus of group T increased significantly in the TUNEL method ( $P<0.01$ ). Compared with group C or before experiment, the lateral cerebral ventricle width and the diameter of midbrain aqueduct in group T increased after 21-day stress ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** After the chronic stress, the apoptosis of the neurons in the rats hippocampus were increases and the MR image of brain shows cerebral atrophy.

**【Key words】** Stress; Hippocampus; Apoptosis; Magnetic resonance(MR)

抑郁症是一种最常见的精神疾患,其终生患病率为 5.2%~16.2%<sup>[1]</sup>。目前医学界普遍认为抑郁症是一个与遗传因素有关的,由环境因素所致的多基因性疾病。研究显示它并不是完全的功能性精神障碍,部分抑郁症患者大脑特定部位的结构性损害可能就是其症状的病理基础。

当机体感受应激源的时程延长时,下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA 轴)功能持续亢进,导致高皮质醇血症。有关实验发现持续的高皮质醇血症可导致海马神经元的萎缩、退化和丢失<sup>[2]</sup>,最终出现一系列的行为效应,如记忆、认知和行为的改变,这可能是抑郁症临床表现产生的原因之一。

本研究以慢性不可预见性综合应激合并孤养刺激所致的抑郁症模型大鼠作为对象,采用磁共振检查手段,探讨中枢神经元损伤与大脑结构、功能改变之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 中国医科大学实验动物部提供的青年雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重在 185g~255g 之间。

1.1.2 试剂 TUNEL 试剂盒由 Boster 公司提供。

1.1.3 仪器 YSD-4G 型药理生理实验多用仪; Meta Morph/Cool Snapfx/Ax70 计算机图像分析系统;

1.5T 磁共振机(日本 TOSHIBA 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 分组 所有大鼠群养,适应实验室环境一周(周围环境为自然昼夜节律光照,室温 18–20℃左右,控制干扰声音和光线,自由进食、水)。然后采用旷场分析法测定行为(包括 5 分钟内中央格停留时间、水平穿越格数、直立次数、修饰次数和粪便粒数)并称体重,再按随机数字表将其随机分为对照组(C 组,  $n=15$ )和实验组(T 组,  $n=15$ )。

1.2.2 磁共振(MR)检查 使用 2%戊巴比妥钠溶液(40mg/kg 体重)给予腹腔麻醉,对大鼠头部进行 MR 扫描,具体扫描参数为:①横断面  $T_1$  加权采用 SE 序列:TR:450ms,TE:15ms,FA:70/180,NAQ:2.8,FOV:9×9cm,Matrix:256×256。②横断面  $T_2$  加权采用 FSE 序列:TR:3500ms,TE:100ms,FA:90/160,NAQ:4,FOV:9×9cm,Matrix:256×256;横断面扫描范围:鼻尖至外耳孔后方 2cm 之间的区域。③矢状面  $T_1$  加权采用 SE 序列:TR:450ms,TE:15ms,FA:70/180,NAQ:2,FOV:9×9cm,Matrix:256×256;矢状面扫描范围:两侧外耳孔之间的区域。所有图像分辨率:0.4mm×0.4mm 层厚:4mm。

1.2.3 应激过程 T 组大鼠为单只分笼喂养和连续 21 天的刺激:热刺激(45 摄氏度,5min);夹尾(1min);摇晃(频率为 1 次/秒,15min);电击足底(电流强度为 1mA,10s/次,间隔 1min 刺激 1 次,共 30 次);冰水强迫游泳(水温 4 摄氏度,5min);禁食(48h);禁水(24h)。每天给予一种刺激,为不可预期性刺激,每种刺激累计使用 2–3 次。C 组大鼠分 5 只/笼喂养,不给予任何刺激。

1.2.4 头部 MR 复查、取材与切片 第 22 天所有大鼠在称量体重与旷场分析法评分后,再次于腹腔

麻醉后进行头部 MR 扫描,操作同前。行左心室穿刺并先后灌注 37℃生理盐水 150ml 和 4℃的 4%多聚甲醛溶液 250ml,剥离脑组织并置于 4%多聚甲醛溶液中后固定 48h 以上,再行梯度乙醇脱水,石蜡包埋后,进行冠状切片。

1.2.5 海马神经元细胞凋亡的测定 对标本进行 TUNEL 原位标记染色。

1.2.6 图像分析 在计算机图像分析系统(Meta Morph/Cool Snapfx/Ax70)分别测量双侧海马  $CA_1$  区、 $CA_3$  区和齿状回(DG)内凋亡细胞所占切面面积的百分比及凋亡细胞计数。

1.2.7 磁共振图像分析 由两位放射线科教授分别阅读磁共振图像并测量  $T_2$  加权图像的侧脑室宽度及中脑导水管直径。具体方法为选择相同部位,侧脑室宽度取上下径的最大值,针对每一测量值均测量 2 次,然后取其平均值记录。

1.2.8 统计分析 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析,所有数据均采用两样本均数的  $t$  检验。

## 2 结 果

### 2.1 体重和旷场分析法测定结果

实验后的 T 组与 C 组相比:体重减轻( $t=-2.40$ ,  $P<0.05$ );中央格停留时间延长( $t=5.53$ ,  $P<0.01$ );水平穿越格数减少( $t=-3.90$ ,  $P<0.01$ );直立次数减少( $t=-2.99$ ,  $P<0.01$ );修饰次数减少( $t=-3.77$ ,  $P<0.01$ );粪便粒数增多( $t=5.13$ ,  $P<0.01$ )。见表 1。

### 2.2 TUNEL 染色结果

在 T 组及 C 组海马各区均可以观察到细胞核内有棕黄色颗粒的凋亡细胞。慢性应激后 T 组与 C 组比较,凋亡细胞所占比例及凋亡细胞计数明显增加,两组有显著性差异( $P<0.01$ )。见表 2。

表 1 实验后大鼠体重和开场行为的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	体重(g)	中央格时间(s)	水平穿越格数	直立次数	修饰次数	粪便粒数
C 组	322.00±30.34	1.97±0.93	39.80±18.58	14.80±5.88	7.27±2.87	1.93±1.16
T 组	297.33±25.83*	5.14±2.02**	19.00±9.01**	9.47±3.64**	3.93±1.87**	4.93±1.94**

注:与 C 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,下同。

表 2 海马各亚区 TUNEL 染色结果

组别	$CA_1$		$CA_3$		DG	
	阳性细胞百分比	阳性细胞计数	阳性细胞百分比	阳性细胞计数	阳性细胞百分比	阳性细胞计数
C 组	0.86±0.49	6.53±2.19	0.69±0.53	6.17±2.05	0.71±0.35	7.21±2.13
T 组	6.05±2.21**	18.91±4.54**	5.02±2.26**	16.11±3.18**	7.23±2.17**	19.01±5.05**

### 2.3 大鼠头部磁共振图像所见

2.3.1 头部 MR 横断面  $T_1$  及  $T_2$  加权图像 C 组大鼠实验前后侧脑室及中脑导水管无明显变化;T 组大鼠实验后侧脑室较实验前明显扩张、中脑导水管较实验前明显增粗。

2.3.2 头部 MR 矢状面  $T_1$  加权图像 C 组大鼠实

验前后蛛网膜下腔及脑沟、脑裂无明显变化;T 组大鼠实验后蛛网膜下腔较实验前增宽,脑沟、脑裂较实验前加深。

### 2.4 大鼠头部磁共振图像测量结果比较

2.4.1 侧脑室宽度 实验前 T 组大鼠的侧脑室宽度与 C 组相比无明显差异( $t=-0.07$ ,  $P>0.05$ );实验后 T

组比 C 组显著增加 ( $t=30.41, P<0.01$ ); T 组大鼠在实验后较实验前侧脑室宽度显著增大 ( $t=29.50, P<0.01$ ); C 组则实验后与实验前相比无明显变化 ( $t=1.13, P>0.05$ )。

2.4.2 中脑导水管直径 实验前 T 组大鼠的中脑导水管直径与 C 组相比无明显差异 ( $t=1.31, P>0.05$ ); 实验后 T 组比 C 组显著增加 ( $t=32.06, P<0.01$ ); T 组在实验后比实验前中脑导水管直径显著增大 ( $t=48.70, P<0.01$ ); C 组则实验后与实验前相比无明显变化 ( $t=-0.13, P>0.05$ )。见表 3。

表 3 两组大鼠头部磁共振图像数据的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	侧脑室宽度 (mm)		中脑导水管直径 (mm)	
	实验前	实验后	实验前	实验后
C 组	0.9120±0.0444	0.9327±0.0661	0.4340±0.0216	0.4353±0.0354
T 组	0.9110±0.0618	1.7580±0.0818** <sup>##</sup>	0.4480±0.0353	0.9587±0.0524** <sup>##</sup>

注:与 C 组相比, \*\* $P<0.01$ ; 与本组实验前相比, ## $P<0.01$

### 3 讨 论

本研究中, 经过 21 天的慢性综合应激之后, T 组大鼠与 C 组大鼠相比: 中央格停留时间增加 (反映动物的认知能力), 水平穿越格数 (反映活动度) 明显减少, 直立次数 (代表对新鲜环境的好奇程度) 显著减少, 修饰行为受到明显抑制, 粪便粒数 9 反映动物的紧张程度) 显著增加。这些认知损害、活动减少, 兴趣丧失和快感缺乏的表现与抑郁症的精神运动性抑制、兴趣或快感的丧失等症状有一定的相似性。

海马是介导应激反应的最重要脑区之一, 也是糖皮质激素 (GC) 作用的主要靶区。神经元的丢失有坏死和凋亡两种形式, 以凋亡为主。研究显示应激对海马神经元的损害主要表现在: 抑制海马齿状回颗粒细胞神经元的发生, 降低新发生神经元的存活率; 改变海马 CA<sub>3</sub> 锥体细胞树突结构, 造成树突分支缩短和分支数量的减少, 甚至 CA<sub>3</sub> 区神经元的缺失<sup>[3]</sup>。应激导致海马神经元受损的机制有两方面: 一方面是保护性因素的降低, 如脑源性神经营养因子 (BDNF) 的减少<sup>[4]</sup>; 另一方面, 损害性因素的增强, 如一氧化氮 (NO) 升高会产生神经元毒性<sup>[5]</sup>。海马的损害在慢性应激时的高皮质醇血症中起重要作用, 高皮质醇血症可增加细胞外谷氨酸的积聚, Ca<sup>2+</sup> 通过 NMDA 受体门控通道大量进入细胞内, 造成细胞的兴奋性损伤, 由此 NMDA 受体拮抗剂的抗抑郁作用也得到证实<sup>[6]</sup>, 进一步推测, 继发性谷氨酸堆积及其 NMDA 受体参与甚至介导了 GC 的神经元毒性作用。海马对于应激性损伤是极为敏感的, 有人认为明显的神经元丧失可能是海马体积缩小的因素之一<sup>[7]</sup>, 而慢性应激或长期抑郁引起的 CNS 萎缩又是以海马为主的<sup>[8]</sup>。正常海马可抑制 HPA 轴的活性, 但慢性应激时的高 GC 血症损伤海马, 抑制作用减弱而导致

HPA 轴活动增强, 从而增强高 GC 血症, 持续的高 GC 血症又反过来可加重海马的损害, 这就是糖皮质激素级联假说<sup>[9]</sup>。这一恶性循环可能是应激相关疾病, 如复发性抑郁症、PTSD 的发病机制之一。

本研究的大鼠头部磁共振图像分析结果显示: 实验后的 T 组大鼠无论与实验前的自身还是与实验后的 C 组相比, 其侧脑室宽度和中脑导水管直径都明显增大, 蛛网膜下腔增宽, 脑沟、脑裂加深, 间接表示实验后的 T 组大鼠有脑萎缩的征象。这与抑郁症患者经计算机断层扫描、正电子断层扫描和 MRI 等检查所得出的侧脑室扩大、脑沟增宽, 前脑、基底节和胼胝体膝下区体积缩小的结果<sup>[10]</sup>类似, 而其他应激相关疾病的患者也都存在脑形态学的改变。

### 参 考 文 献

- 1 Bland RC. Epidemiology of affective disorder: a review. *Can J Psychiatry*, 1997, 42(4): 367-77
- 2 Vollmayr B, Simonis C, Weber S, et al. Reduced cell proliferation in the dentate gyrus is not correlated with development of learned helplessness. *Biological Psychiatry*, 2003, 54(10): 1035-1040
- 3 Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neuron: Comparison of stressor. *Neuroscience*, 1997, 69(1): 83-88
- 4 Li XH, Liu NB, Zhang MH, et al. Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(8): 669-74
- 5 Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, et al. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28(9): 1579-88
- 6 Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. Stress and depression: Possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord*, 2002, 4(2): 117-128
- 7 Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: A primer on neuron death. *Biol Psychiatry*, 2000, 48(8): 755-765
- 8 Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22): 12796-12801
- 9 O'Brien JT. The glucocorticoid cascade hypothesis in man: Prolonged stress may cause permanent brain damage. *Br J Psychiatry*, 1997, 170: 199-201
- 10 Blaine SG, Elisse KG, Krishnan KR, et al. MRI signal hyperintensities in geriatric depression. *Am J Psychiatry*, 1996, 153: 1213-1215

(收稿日期: 2010-02-15)