

新生儿孤养对成年大鼠行为与 5-羟色胺转运体表达的影响

江雪华^{1,2}, 张敏^{*}, 陆大祥¹, 韦佳¹, 戚仁斌¹, 颜亮¹

(1.暨南大学医学院, 广东 广州 510632; 2.广东金融学院劳经系, 广东 广州 510521)

【摘要】 目的:探讨新生儿孤养(neonatal isolation, NI)对成年大鼠行为与 5-羟色胺转运体(5-HTT)表达的影响。**方法:**新生的 SD 大鼠随机分为正常对照(non-handled, NH)组与新生儿孤养组, 新生儿孤养组在出生后 2-14d 每天孤养 4h, 断乳后常规饲养。12w 龄时, 进行旷场、高架十字迷宫和强迫游泳试验, 酶联免疫法检测血浆促肾上腺皮质激素与皮质酮、海马与下丘脑 5-HT 的含量, 原位杂交法观察中缝核 5-HTT mRNA 的表达。**结果:**高架十字迷宫试验中新生儿孤养组大鼠出入开放臂的总次数与进入开放臂的比率显著减少; 强迫游泳试验中新生儿孤养组大鼠悬浮时间显著增多($P<0.05$)。新生儿孤养组大鼠血浆促肾上腺皮质激素与皮质酮显著升高, 海马中 5-HT 含量显著减少, 中缝核 5-HTT mRNA 表达显著增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**新生儿孤养可导致大鼠在成年时出现抑郁和焦虑样行为, 可能与下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进、中枢 5-HT 功能低下有关。

【关键词】 新生儿孤养; 成年大鼠; 行为; 5-羟色胺转运体

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2010)04-0411-04

Neonatal Isolation on Behavior and Expression of Serotonin Reuptake Transporter in Adult Rats

JIANG Xue-hua, ZHANG Min, LU Da-xiang, WEI Jia, QI Ren-bin, YAN Liang

Medical School, Jinan University, Guangzhou 510632, China

【Abstract】 Objective: To investigate the long-term effects of neonatal isolation (NI) on behavior and expression of serotonin reuptake transporter (5-HTT) in adult rats. **Methods:** Sprague-Dawley pup was isolated from dam, nest and littermates daily for 4 hours from post-natal day (PND) 2 to PND14 (NI) or undisturbed (non-handled, NH), and subjected to behavioral sessions for open-field test, elevated plus maze test and forced swim at 12 weeks after birth. The contents of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (Cort) in plasma were examined, as well as the contents of serotonin (5-HT) in the hippocampus and hypothalamus by Enzyme-linked immunosorbent assay. 5-HTT mRNA levels in the dorsal raphe nucleus were observed in situ hybridization. **Results:** Total entries and percent of entries to open arms of elevated plus maze decreased and immobility duration in swim test increased in NI rats compared with NH rats ($P<0.05$). Compared with NH rats, the contents of plasma ACTH and Cort increased while the hippocampus contents of 5-HT decreased and the raphe expression of 5-HTT mRNA increased in NI rats ($P<0.05$). **Conclusion:** The results suggest that NI may result in the development of depression-/anxiety-like behaviors in adult rats, in which the long-term alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis and 5-HTergic neurotransmission may take a role.

【Key words】 Neonatal isolation; Adult rat; Behavior; Serotonin reuptake transporter

临床研究发现, 早期创伤性应激事件与成年期创伤后应激障碍、抑郁症及物质成瘾的发生密切相关, 早期创伤性经历是导致成年期精神疾病易感性增加的高风险因素之一^[1-3]。抑郁症患者下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进, 促肾上腺皮质激素和糖皮质激素的基础水平升高, 在应激条件下 HPA 轴的反应性增强。抑郁症患者中枢多种神经递质系统的功能出现部位特异性的改变, 前额叶皮质的 5-羟色胺(serotonin 5-hydroxytryptamine, 5-HT)系统功能低下, 脑内 5-HT 含量不足^[4]。

基于临床研究的发现, 利用生命早期应激建立动物模型将有助于研究成年期精神疾病易感性的发

生机制^[4]。新生儿孤养(neonatal isolation, NI)是一种将新生幼鼠进行孤养的生命早期应激模式, 研究表明经历新生儿孤养的成年大鼠自己摄取(self-administration)可卡因的数量显著增多^[5], 海马功能受损, 学习记忆能力减退^[6]。本实验观察新生儿孤养是否导致成年大鼠表现出焦虑样与抑郁样行为, 是否对 HPA 轴与中枢 5-HT 产生影响, 为干预和应对生命早期应激所诱发的成年期抑郁症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康怀孕 Sprague-Dawley 大鼠 8 只, 购买并饲养于中山大学实验动物中心。室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下饲

* 复旦大学社会学博士后流动站

养,相对湿度为40–70%,每天保证12h光照,大鼠自由饮水摄食,四周环境清洁、安静。在孕鼠生产的当天,对每窝新生幼鼠进行挑选,剔除不健康的幼鼠,每窝保留12只幼鼠,雌雄各半。

将8窝新生大鼠随机分成两组,每组4窝:正常对照组(non-handled, NH)和新生期孤养组。正常对照组的4窝幼鼠常规饲养。新生期孤养组的4窝幼鼠在出生后2–14d,每天8:00–12:00将单只幼鼠从窝内取出,放置于10cm×10cm×10cm的黑色塑料盒内,在室温下(25℃)孤养4h,然后放回母鼠窝内。8窝幼鼠在出生后第21d断乳,分笼常规饲养。两组幼鼠按窝别、性别与体重随机各挑选14只,雌雄各半,剩余幼鼠供其它试验使用。

1.2 试剂与仪器

BIO–RAD Model 550 Microplate reader 酶标仪,美国伯乐公司产品。BX51显微镜,日本Olympus产品。大鼠促肾上腺皮质激素、皮质酮与5-HT酶联免疫试剂盒,Adlitteram Diagnostic Laboratories公司产品。5-羟色胺转运体(serotonin reuptake transporter, 5-HTT)原位杂交检测试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 行为学检测

大鼠12w龄时,按窝别、性别与体重在对照组和孤养组大鼠中随机选取8只,雌雄各半,进行行为学试验。试验时室内为暗光,均在14:00–17:00之间进行,以避免昼夜节律(circadian variance)对大鼠行为的影响,各项试验之间间隔1w。

1.3.1 旷场试验 将大鼠轻轻放入旷场实验箱(48cm×48cm×48cm)的正中格,记录5min内大鼠的穿格次数与直立次数,反映大鼠的自发活动情况;记录5min内大鼠在正中格停留时间、进入正中格的次数、停止不动的时间、首次停止不动的潜伏期,反映大鼠的焦虑样行为。

1.3.2 高架十字迷宫试验 高架十字迷宫包括两条开放臂和两条闭合臂,由中央区联结。大鼠从中央区面向开放臂放入迷宫,记录5min内大鼠进入闭合臂与开放臂的次数、闭合臂与开放臂的停留时间、危险评估行为次数(后腿直立、伸长身体与向下探究),计算大鼠出入开放臂的总次数(进入开放臂次数+进入闭合臂的次数)、进入开放臂的比率(进入开放臂的次数/出入开放臂的总次数)。

1.3.3 强迫游泳试验 试验第一天将大鼠快速放进一个塑料桶中(高40cm;直径18cm),塑料桶中有18cm深的水,水温控制在25℃,进行15min的强迫

游泳训练。试验第二天将大鼠放入塑料桶中,记录大鼠5min的游泳全过程,进行行为测试。记录测试过程中大鼠的潜伏期与悬浮时间。潜伏期为从实验开始到大鼠首次出现悬浮状态所经过的时间,悬浮时间为在整个实验期间大鼠处于悬浮状态的时间,悬浮状态为大鼠在水中身体基本保持不动或仅后肢有轻微运动以维持头部露出水面。

1.4 神经内分泌检测

1.4.1 血浆促肾上腺皮质激素与皮质酮 行为学试验后,大鼠剪尾取血1ml,置于EDTA抗凝管,分离血浆,酶联免疫法检测ACTH与皮质酮(corticosterone, Cort)的含量。

1.4.2 脑内5-HT的含量 取血后的大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,断头后冰块上取脑,分离海马与下丘脑,用生理盐水制成10%的匀浆,4000rpm离心10min,取上清液,用酶联免疫法检测5-HT的含量。

1.4.3 原位杂交法检测中缝背核5-HTTmRNA的表达 地高辛标记的寡核苷酸探针序列为:①GGCGT TTTCC CTACA TATGC TCCCA GAATG;②AGGTG GTGTG GGTGA CAGCC ACCTT CCCTT;③TG GTT TTGGA GGATC TGCTG GGTGG CCATC。在未接受行为学检测的12w龄大鼠中,两组各随机选取6只,雌雄各半,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,断头后冰块上分离中缝背核(dorsal raphe nucleus, 前囟–7.30~–8.00)^[7]。迅速以4%多聚甲醛固定,常规脱水,透明石蜡包埋,连续切片,厚度5μm,取其中1套切片进行原位杂交,脱蜡至水,3% H₂O₂ 室温10min去除内源性过氧化物酶,3%柠檬酸稀释的胃蛋白酶消化,加地高辛标记的5-HTT寡核苷酸探针杂交,封闭,滴加生物素化鼠抗地高辛,滴加SABC(Strept Avidin–Biotin Complex),滴加生物素化过氧化物酶,3–32二氨基苯联胺(DAB)显色,封片。光镜观察以胞浆呈棕黄色为阳性细胞,不加探针作为空白对照。原位杂交结果在400倍视野下,每张玻片随机取4个视野,用Image Pro–Plus显微图像分析系统分别测定阳性细胞的累积光密度(integrated optical density, IOD)值,4个视野的IOD平均值作为该片指标的代表值。

1.5 统计学分析

使用SPSS13.0进行统计分析。

2 结果

2.1 行为学检测

与正常对照组相比,在旷场试验中,新生期孤养

组大鼠穿格次数、直立次数与粪便颗粒数有所增加,首次停止不动的潜伏期缩短,正中格停留时间增多,但差异无统计学意义。在高架十字迷宫试验中,新生期孤养组大鼠出入开放臂的总次数与进入开放臂的比率显著减少,在开放臂停留时间减少,在闭合臂停留时间增多,后腿直立行为增多,伸长身体行为减少,但差异无统计学意义。在强迫游泳试验中,孤养组大鼠首次出现悬浮状态的潜伏期缩短,但差异无统计学意义,悬浮时间则显著增多。见表 1。

2.2 神经内分泌检测

与正常对照组相比,新生期孤养组大鼠血浆 ACTH 和 Cort 含量显著升高;海马的 5-HT 含量显著减少,下丘脑 5-HT 的含量减少,但差异无统计学意义;中缝背核神经元中 5-HTT mRNA 表达相对增强,光密度结果表明,新生期孤养组大鼠阳性细胞的 IOD 值高于正常对照组。见表 2。

表 1 大鼠在行为学试验中各项指标的比较($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

		正常对照组	新生期孤养组	F
旷场试验	穿格次数	78.63±15.01	86.00±25.18	0.506
	直立次数	28.63±5.83	31.13±11.21	0.313
	粪便颗粒数	1.38±1.60	2.25±2.55	0.677
	正中格停留时间(s)	8.63±4.10	10.88±4.02	1.229
	进入正中格的次数	6.19±2.13	5.82±1.85	0.131
	停止不动的时间(s)	28.12±15.60	28.88±16.07	0.049
高架十字迷宫试验	首次停止不动的潜伏期(s)	174.50±58.72	136.75±69.19	1.384
	在开放臂停留时间(s)	63.75±34.45	43.75±35.48	1.309
	在闭合臂停留时间(s)	206.13±44.66	230.63±40.47	1.322
	出入开放臂的总次数	13.38±2.97	9.63±2.92*	6.468
	进入开放臂的比率%	33.41±11.49	22.15±9.33*	4.627
	后腿直立	11.63±3.38	13.50±3.93	1.048
强迫游泳	伸长身体	11.88±2.53	10.25±2.49	1.673
	向下探究	6.50±2.56	6.75±2.96	0.033
	潜伏期 (s)	75.13±30.32	48.13±24.11	3.887
试验	悬浮时间 (s)	100.13±53.64	157.00±46.00*	5.182

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,下同。

表 2 大鼠神经内分泌检测各项指标的比较($\bar{x}\pm s$; $n=8$)

	正常对照组	新生期孤养组	F
ACTH (pg/ml)	188.88±33.63	229.51±32.49*	6.04
Cort (ng/ml)	281.44±55.03	360.24±42.80**	10.219
5-HT(海马) (ng/g tissue)	417.70±82.09	343.67±46.95*	4.903
5-HT(下丘脑) (ng/g tissue)	380.04±75.83	351.38±76.21	0.57
IOD($\times 10^3$)	27.02±6.83	40.14±12.63*	5.014

3 讨 论

临床研究发现,有早期创伤性经历(如丧亲、长期与父母分离以及儿童期受虐或忽视)的人群在成年期抑郁、躁狂、精神分裂症等精神疾病的发病率显著高于正常人群^[8,9]。对大学生的调查研究表明,儿童期的情感虐待与躯体忽视是影响大学生心理健康的危险因素^[10],对初一到四大的青少年的调查研究表明,童年期的情感忽视、情感虐待能有效预测青少年抑郁的发生^[11]。新生期孤养是一种强度较大的生

命早期应激方式,幼鼠不但与母鼠而且与其他的幼鼠隔离。本研究表明经历新生期孤养的大鼠在成年表现出一定的焦虑样和抑郁样行为:在高架十字迷宫试验中,新生期孤养组大鼠出入开放臂的总次数显著减少,进入开放臂的比率也显著减少,经历新生期孤养的大鼠在成年时活动性减弱,更愿意进入相对安全的闭合臂;在强迫游泳试验中,新生期孤养组大鼠悬浮时间显著多于正常对照组大鼠,经历新生期孤养的成年大鼠具有行为绝望的高易感性。

McCormick 等研究发现在出生后 2-8d 每天进行 1h 新生期孤养的大鼠幼鼠血浆皮质酮含量显著升高,出生后第 2d,新生期孤养组幼鼠的血浆皮质酮含量是正常对照组幼鼠的 2 倍,在出生后第 9d,新生期孤养组幼鼠的血浆皮质酮含量是正常对照组幼鼠的 4 倍^[12]。在本研究中,新生期孤养组大鼠与正常对照组相比,血浆 ACTH 和 Cort 含量显著升高,这说明新生期孤养可能对大鼠的 HPA 轴功能造成持续影响,导致成年大鼠 HPA 轴功能亢进。

中缝背核是 5-HT 能神经元大量存在的部位,由此处发出的 5-HT 投射到前额叶皮质、海马、边缘皮质、下丘脑、基底神经节与脊髓^[13]。5-HT 经突触释放后,一方面作用于受体,另一方面通过突触前膜上的 5-HTT 蛋白重摄取,5-HTT 在 5-HT 重摄入突触前膜神经元的过程中发挥着重要的调节作用。选择性 5-HT 再摄取抑制剂是一类常用的抗抑郁剂,如氟西汀等,通过选择性地抑制 5-HTT,提高脑内 5-HT 的含量,从而减轻抑郁症状^[14]。在本研究中,新生期孤养组大鼠海马的 5-HT 含量减少,中缝核神经元中的 5-HTT mRNA 表达相对增强,表明经历新生期孤养的大鼠中枢 5-HTT mRNA 持续高表达,突触间隙 5-HT 再摄取增多,脑内 5-HT 含量持续性相对不足。

体外实验表明 5-HT 能显著增强海马神经元糖皮质激素受体 mRNA 的表达水平^[13],海马中的 5-HT 可以通过调节糖皮质激素的负反馈,对 HPA 的功能活动产生影响,海马中 5-HT 含量下降,可以导致 HPA 轴功能亢进,ATCH 与 Cort 释放增多^[15]。本研究表明 HPA 轴功能亢进,中枢 5-HT 功能减弱可能是导致经历新生期孤养的大鼠在成年时表现出焦虑样与抑郁样行为的神经生物学机制。

参 考 文 献

- 1 Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, 2001, 49(12): 1023-

- 1039
- 2 Kendler KS, Bulik CM, Silberg J, et al. Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women. *Archives of General Psychiatry*, 2000, 57(10): 953-959
 - 3 Yehuda R, Halligan SL, Grossman R. Childhood trauma and risk for PTSD: Relationship to intergenerational effects of trauma, parental PTSD, and cortisol excretion. *Development and Psychopathology*, 2001, 13(3): 733-753
 - 4 Gilmer WS, McKinney WT. Early experience and depressive disorders: Human and non-human primate studies. *Journal of Affective Disorders*, 2003, 75: 97-113
 - 5 Kosten TA, Zhang XY, Kehoe P. Heightened cocaine and food self-administration in female rats with neonatal isolation experience. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31(1): 70-76
 - 6 Kosten TA, Karanian DA, Yeh J, et al. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2007, 88(2): 167-176
 - 7 Paxinos G, Watson C, 著. 诸葛启钊, 主译. 大鼠脑立体定位图谱(第三版). 北京: 人民卫生出版社, 2005
 - 8 Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. *American Journal of Psychiatry*, 2002, 159(7): 1133-1145
 - 9 Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in men. *American Journal of Psychiatry*, 2006, 163(1): 115-124
 - 10 施春华, 林晓娇. 儿童期创伤经历、人格特征与大学生心理健康的相关研究. *中国临床心理学杂志*, 2009, 17(1): 87-89
 - 11 凌宇, 杨娟, 钟斌, 章晨晨, 姚树桥. 童年创伤经历与自尊对青少年抑郁的影响. *中国临床心理学杂志*, 2009, 17(1): 54-56
 - 12 McCormick CM, Kehoe P, Kovacs S. Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: Evidence of sensitization. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 1998, 16(3-4): 175-85
 - 13 Lee J, Kim JH, Kim JG, et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience Research*, 2007, 58(1): 32-39
 - 14 Gorman JM, Kent JM. SSRIs and SMRIs: broad spectrum of efficacy beyond major depression. *Journal of Clinical Psychiatry*, 1999, 60(4): 33-38
 - 15 Erdeljan P, Andrews MH, MacDonald JF, Matthews SG. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor mRNA levels in fetal guinea-pig hippocampal neurons, in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 2005, 17(7): 743-749

(收稿日期:2010-01-31)

(上接第 410 页)

- 3 Stephens R, Tunney RJ. How does chewing gum affect cognitive function? Reply to Scholey (2004). *Appetite*, 2004, 43: 217-218
- 4 Tucha O, Mecklinger L, Maier K, Hammerl M, Lange KW. Chewing gum differentially affects aspects of attention in healthy subjects. *Appetite*, 2004, 42: 327-329
- 5 Tucha O, Mecklinger L, Hammerl M, Lange KW. Effects of gum chewing on memory and attention: Reply to scholey. *Appetite*, 2004, 43: 219-220
- 6 Stephens R, Tunney RJ. Role of glucose in chewing gum-related facilitation of cognitive function. *Appetite*, 2004, 43: 211-213
- 7 张厚粲, 王力. 嚼口香糖对个体学习和记忆的积极影响. *中国健康心理学杂志*, 2007, 15(6): 518-520
- 8 张厚粲. 咀嚼口香糖对个体注意功能的影响. *中国临床心理学杂志*, 2008, 16(5): 485-488
- 9 Tahara Y, Sakurai K, Ando T, Shimada T, et al. Influence of chewing and clenching on salivary cortisol levels as an indicator of stress. *J Prosthodont*, 2007, 129-135
- 10 岳珍珠, 黄立, 周晓林. 口香糖咀嚼的脑机制. *心理科学*, 2006, 29(5): 1153-1155
- 11 Hollingworth HL. Chewing as a technique of relaxation. *Science*, 1939, 90: 385-387
- 12 Morinushi T, Masumoto Y, Kawasaki H, Takigawa M. Effect on electroencephalogram of chewing flavored gum. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2000, 54: 645-651
- 13 刘潇楠, 许翱翔, 周仁来. 国际情绪图片系统的本土化研究: 在中国大学生群体中的评定. *中国临床心理学杂志*, 2009, 17(6): 687-692
- 14 Wetherell MA, Sidgreaves MC. Short communication: Secretory immunoglobulin-a reactivity following increases in workload intensity using the defined intensity stressor simulation (DISS). *Stress Health: J Int Soc Investig Stress*, 2005, 21: 99-106
- 15 Bond A, Lader M. The use of analogue scales in rating subjective feelings. *Br J Med Psychol*, 1974, 47: 211-218
- 16 Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 1994, 19: 313-333
- 17 Scholey AB, Moss MC, Neave N, Wesnes K. Cognitive performance, hyperoxia, and heart rate following oxygen administration in healthy young adults. *Physiol Behav*, 1999, 67: 783-789

(收稿日期:2009-12-30)