

慢性应激对大鼠海马 Bcl-xl 表达的影响及应激后的变化

毕波, 王哲, 彭淼, 金魁和, 韩继阳, 朱宇章

(中国医科大学精神医学与医学心理学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

【摘要】 目的: 探讨慢性应激对大鼠海马神经元 Bcl-xl 蛋白表达的影响及其应激后的变化。方法: 采用慢性强迫冰水游泳制作动物模型。运用 open-field 法观察大鼠行为学的变化, 运用免疫组织化学方法观察大鼠海马 DG 区、CA3 区 Bcl-xl 的变化。结果: 与对照组相比, 实验组 1 大鼠海马 CA3 区齿状回(DG)区 Bcl-xl 平均灰度值显著增加 ($t = 4.69, P < 0.05$ 和 $t = 3.77, P < 0.01$), 实验组 2 平均灰度值与对照组 2 相比同样增加 ($t = 3.35, P < 0.05$ 和 $t = 3.30, P < 0.05$)。结论: 慢性应激使大鼠海马 Bcl-xl 表达降低, 应激三十天后, 其表达仍低于对照组。

【关键词】 慢性应激; 海马; Bcl-xl; 强迫游泳

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2005)02-0144-03

Effects of Chronic Stress on the Expression of Bcl-xl in Hippocampus of the Rats

BI Bo, WANG Zhe, PENG Miao, et al

Department of Psychiatry, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 **Objective:** To observe the changes of Bcl-xl expression in hippocampus of the rats with the forced-swimming and the changes of Bcl-xl after poststress. **Methods:** The protocol was established with the forced-swimming as the chronic stress model. Open-field test was executed to measure the behaviors of the rats. Immunohistochemistry was used to observe the changes of Bcl-xl expression in the hippocampus. **Results:** Compared to the control group, the expression of Bcl-xl in CA3 region of the hippocampus and dentate gyrus(DG) of the rats was decreased morphologically. With the computerized image analysis, the gray degree increased significantly ($P < 0.01$) and the changes showed the same results after the poststress. **Conclusion:** Chronic stress decreased the expression of the Bcl-xl in CA3 region and DG in the hippocampus of the rats and the changes showed the same results after the poststress.

【Key words】 Chronic stress; Hippocampus; Bcl-xl; Forced-swimming

应激是一种生物学上改变神经细胞特质的重要因素, 能干扰认知过程, 能增加海马神经元由于代谢的变化而引起凋亡或死亡的敏感性^[1]。慢性应激反应中海马出现体积减小, CA3 区锥体细胞萎缩, 数目减少, 齿状回颗粒细胞增生抑制, 长时程增强(LTP)异常^[2,3]。临床研究表明在抑郁障碍、创伤后应激障碍(PTSD)的患者中同样存在神经元、神经胶质细胞数量和体积的减少, 皮质厚度变薄以及脑血流量和糖代谢的降低^[4]。慢性应激使机体内稳态失衡, 一系列的神经生化改变可导致与情绪密切相关的海马结构受到损害, 但是其发生机制尚不清楚^[5]。Bcl 家族是目前备受关注的与细胞凋亡关系密切的基因之一, 它是一个大家族, 有多个家族成员, 如 Bcl-2, Bax, Bal-xl, Bad 等。其中 Bcl-2 (B 细胞淋巴瘤/白血病-2, B cell lymphoma/Leukemia-2) 及 Bcl-xl 主要抑制细胞凋亡, 而 Bax 则促进凋亡。已有学者提出慢性应激可能导致海马 CA3 区神经元细胞凋亡增加^[6]。本文想通过用免疫组织化学方法检测海马 CA3 区、DG 区抑制细胞凋亡的 Bcl-xl 调节因子的表达来研究凋亡因子在慢性应激及应激后的变化。

1 对象与方法

1.1 实验动物

成年 Wistar 雄性大鼠 32 只 (由中国医科大学动物实验室提供), 体重 160~180g。将实验大鼠置于自然昼夜节律光照条件下, 自由进食、饮水, 每笼 6~8 只, 控制室温于 18~20℃。大鼠适应环境 1 周后, 称重, 并采用 Open-field (开场) 实验测定行为, 记录大鼠 5 min 内的动作行为表现, 包括中央格停留时间、水平穿越格数、竖立次数、修饰次数和粪便粒数。依体重和 Open-field 实验评分, 将大鼠随机分为四组, 每组 8 只, 分别为对照组 1、对照组 2、实验组 1 和实验组 2。各组间体重和 Open-field 实验评分均无显著性差异。对照组每笼喂养 4 只, 实验组单笼喂养。

1.2 实验方法

将实验组 1 和实验组 2 的大鼠每天上午十点钟放入长宽 50cm×60cm、水深 25cm、水温恒定 0℃的冰水玻璃缸中强迫游泳 5min, 每天给予刺激一次, 共 21 天。对照组 1 与对照组 2 的大鼠放笼中群养, 不给任何刺激。第 22 天杀死对照组 1 和实验组 1 的

大鼠, 实验组 2 停止强迫游泳和对照组 2 继续喂养, 30 天后, 处死动物。各组大鼠在被处死前均采用 Open-field 法测定大鼠的行为并称体重。处死方法: 用戊巴比妥 (50–60mg/kg) 经腹腔麻醉, 麻醉起效后将大鼠固定于灌流台上, 剖开胸腔, 经左心室快速灌注 37°C 生理盐水 (含适量肝素) 150–200ml, 继而灌注 4% 多聚甲醛溶液 (用 PBS 配制, PH=4) 200–300ml, 持续 30–40min 后, 取脑组织并修块。将脑修块置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 小时, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋后, 冠状切片, 片厚约 7 μ m。

通过 ABC 免疫组化染色方法检测凋亡抑制因子 Bcl-xl 的蛋白表达。切片经脱蜡、水化后入 PBS (PH7.4), 3% H₂O₂ 10 分钟内去除过氧化物酶, 切片用微波进行抗原修复, 然后进行免疫组织化学 ABC 法染色。用兔抗鼠 Bcl-xl 作为一抗, 工作浓度为 1:200。用生物素化的羊抗兔 IgG 作为二抗, 工作浓度为 1:200。最后加 ABC 复合物, 工作浓度为 1:100, 最后加 DAB 显色液显色 5–10 分钟。

每只大鼠取双侧海马 CA3 区 DG 区切片各两

张, 在计算机图像分析系统 (Meta Morph/Ax70) 上测量 Bcl-xl 平均光密度和平均目标灰度值 (所测阳性细胞平均灰度), 灰度单位分为 256 个等级, 免疫反应的强弱与灰度值呈反比关系。

2 结 果

2.1 开场行为比较

实验组与对照组大鼠第 21 天的数据相比 (表 1), 慢性应激后实验组大鼠的体重增加减少 ($t = -4.07, P < 0.01$), 中央格停留时间延长 ($t = 2.42, P < 0.05$), 水平穿越格数减少 ($t = -5.40, P < 0.01$), 竖立次数减少 ($t = -5.70, P < 0.05$), 修饰次数减少 ($t = -3.00, P < 0.01$), 粪便粒数无明显差异 ($t = 0.638, P > 0.05$)。应激后 30 天, 实验组 2 与对照组 2 相比, 大鼠的体重增加减少 ($t = -2.80, P < 0.01$), 中央格停留时间延长 ($t = 3.13, P < 0.05$), 水平穿越格数减少 ($t = 3.89, P < 0.01$), 竖立次数减少 ($t = -2.73, P < 0.05$), 修饰次数减少 ($t = -2.54, P < 0.05$), 粪便粒数无明显差异 ($t = 0.527, P > 0.05$)。

表 1 大鼠开场行为的比较

	体重(g) (n=8)	中央格时间(s) (n=8)	水平穿越格数 (n=8)	竖立次数 (n=8)	修饰次数 (n=8)	粪便粒数 (n=8)
对照组 1	259.63±25.32	0.98±0.36	31.75±8.75	14.00±4.34	10.25±5.75	1.75±1.03
实验组 1	203.88±29.34**	3.05±2.40*	19.50±6.78**	4.37±1.99*	3.37±2.97**	1.37±1.30
对照组 2	323.38±20.00	0.70±0.42	29.75±9.57	12.88±5.84	9.63±3.16	2.13±1.55
实验组 2	295.50±19.79*	3.55±2.54*	15.37±4.21**	5.63±4.72*	6.13±2.30*	1.75±1.28

注: 对照组 1 与实验组 1 比较, 对照组 2 与实验组 2 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。

2.2 Bcl-xl 表达的比较

实验组 1 大鼠海马 CA3 区 DG 区 Bcl-xl 阳性细胞平均光密度比对照组 1 降低 ($t = -5.97, P < 0.01$ 和 $t = -5.15, P < 0.01$), 平均灰度值增加 ($t = 4.69, P < 0.05$ 和 $t = 3.77, P < 0.01$)。实验组 2 大鼠海马 CA3 区 DG 区 Bcl-xl 阳性细胞平均光密度比对照组 2 降低 ($t = -3.24, P < 0.01$ 和 $t = -2.65, P < 0.01$), 平均灰度值增加 ($t = 3.35, P < 0.05$ 和 $t = 3.30, P < 0.05$)。

表 2 应激前后大鼠海马 DG 区、CA3 区 Bcl-xl 的表达

	CA3 区		DG 区	
	平均光密度	灰度值	平均光密度	灰度值
对照组 1	0.1781±0.0021	169.42±0.82	0.1778±0.0022	169.54±0.70
实验组 1	0.1728±0.0014**	171.25±0.73*	0.1722±0.0022*	170.94±0.78**
对照组 2	0.1952±0.0034	162.25±1.02	0.1933±0.0037	161.99±1.34
实验组 2	0.1879±0.0053**	165.31±2.38*	0.1868±0.0059*	165.43±2.62*

3 讨 论

慢性应激可损害海马, 引起其结构和功能的改

变。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 CA3 区锥体细胞树突结构, 造成树突分支缩短和分支数量的减少, 甚至 CA3 区神经元的缺失^[7]。Kenker 指出慢性应激会导致海马锥体细胞的树突萎缩, 齿状回颗粒细胞增生的抑制, 但不会引起 CA3 区 CA1 区细胞数目的变化^[8]。有实验者发现应激引起细胞萎缩的现象只发生于海马 CA3 区, 在中缝核等脑区没有此种现象的发生, 说明海马 CA3 区的锥体细胞应激尤其敏感^[9]。

本研究结果表明, 与对照组相比, 实验组大鼠的体重增加量明显减少, 中央格停留时间延长, 水平穿越格数减少, 竖立次数减少, 修饰次数减少, 粪便粒数无明显差异, 提示慢性应激使大鼠出现抑郁样行为。停止应激 30 天以后, 上述改变依然存在, 显示应激后 (poststress) 抑郁样行为持续存在。

细胞凋亡是机体在生长、发育和受到外来刺激

时清除多余、衰老和受损伤的细胞以保持机体内环境平衡的一种自我调节机制。这种调节机制发生障碍和紊乱与肿瘤、爱滋病、老年性痴呆和帕金森氏病等的发生密切相关。许多学者开始注重抑郁症的发生和凋亡的关系。尸检研究表明,抑郁症患者边缘系统的神经元存在细胞凋亡,尤其在海马下脚,齿状回结构和海马 CA1、CA4 的亚区,而这些结构并没有发现大量的神经元的缺失^[10]。

Bcl-2 大家族主要包括细胞凋亡抑制因子,如 Bcl-2、Bcl-xl 与 Bcl-w 等,以及促进凋亡的成员如 Bax、Bak、Bad 与 Bid 等。其中,Bcl-xl 是 Bcl-2 相关蛋白 Bcl-X 的一个亚型,Bcl-XL 的功能是抑制细胞凋亡。近五年来,许多学者认为慢性应激所致的大鼠海马神经元的损伤主要是通过细胞凋亡的方式^[11]。

细胞的凋亡有许多的蛋白质参与,有的启动细胞的死亡,有的维持细胞的生存。Caspase 蛋白通过使维持细胞生存的蛋白的降解而使细胞死亡,Bcl-xl 蛋白则阻止此过程而维持细胞的生存。最近的一些研究揭示了脑源性神经营养因子(BDNF)抑制细胞死亡的机制是通过 MAP 激酶传导通路而实现的。BDNF 与其受体 TrkB 的结合激活此受体,进而通过几个中间环节激活了 MAP 通路。MAP 激酶传导途径的目标之一是 Rsk。Rsk 增加了 CREB 的磷酸化导致 Bcl-xl 的表达增加,从而抑制细胞的凋亡,CREB 可与 Bcl-xl 的启动子结合进而增加 Bcl-xl 基因的表达,从而使细胞存活^[12,13]。

本研究表明,实验组 1 与对照组 1 相比,21 天的冰水强迫游泳应激致大鼠海马神经元 CA3 区、DG 区的抑制细胞凋亡因子 Bcl-xl 的表达降低($P < 0.05$)。应激后三十天,实验组 2 与其对照组 2 相比,Bcl-xl 的表达仍有所降低。这提示 Bcl-xl 表达的降低可能是引起大鼠在慢性应激时产生海马损伤病理机制之一,并且在应激后三十天,损伤持续存在。本研究没有对长时间以后,海马 CA3 和 DG 区 Bcl-xl 水平的观察,目前还不清楚应激后 Bcl-xl 水平低下

是否为持续终生还是一段时间后有代偿性水平增加以恢复海马的功能。

参 考 文 献

- 1 Kim J, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, (3): 453-462
- 2 McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 1999, 22: 1052-1221
- 3 Kim J, Yoon KS. Stress: Metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 1998, 21: 5052-5091
- 4 Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Rev Psychiatr Neurosci*, 2004, 29(3): 196-205
- 5 杨来启, 吴兴曲, 王晓峰, 等. 限制活动慢性应激大鼠脑组织 NO、NOS 含量变化的研究. *中国临床心理学杂志*, 2002, 10(3): 220-221
- 6 Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, et al. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur J Neurosci*, 2001, 14(1): 161-166
- 7 Margarines AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: comparison of stressor. *Neuroscience*, 1995, 69(1): 83-88
- 8 Kenker II, Vollmann-Honsdorf GR, Fuch E. How to use optical fractionator: An example based on estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Res Brain Res Prote*, 2001, 7: 211-221
- 9 Mckittrick CR, Magarinos AM, Blanchard, et al. Chronic stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter site. *Synapse*, 2000, 36: 85-94
- 10 D'Sa C, Duman RS. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord*, 2002, 4: 183-194
- 11 Duman RS. Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatry*, 2002, 7: 29-34
- 12 亓晓丽, 姚树桥. 应激与海马可塑性及其机制的研究进展. *中国行为医学科学*, 2003, 12(3): 356-359
- 13 Bonni A, Brunet A, West AE. Cell survival promoted by the Ras-MAPK pathway by transcription-dependent and independent mechanism. *Science*, 1999, 286: 1358-1366

(收稿日期:2004-11-03)

(上接第 143 页)

adolescence. 1971, 6: 19-38

- 10 Paulson MJ, Lin TT, Hanssen C. Family harmony: An etiologic factor in alienation child develop. 1972, 43: 591-603
- 11 池田政子, 川浦康至等. 既婚者の疏外感に及ぼす夫婦関係と社会的活動の影響. *The Japanese Journal of Psychology*, 1999, 70(1): 17-23
- 12 王希恩. 论中国少数民族传统文化现状及其走向. *民族研究*, 2000, 6: 11-14

- 13 Retzinger, Suzanne S, Thomas. Emotion, alienation and narrative: Resolving conflict. *Mediation Quarterly*, 2000, 18(1): 71-85
- 14 Cozzarelli, Catherine K, Joseph A. Cultural estrangement and terror management theory. *Personality & Social Psychology Bulletin*, 1998, 24(3): 253-267
- 15 汤毅晖, 黄海, 雷良. 青少年疏离感与家庭功能、人格的关系研究. *中国临床心理学杂志*, 2004, 12(2): 158-160

(收稿日期:2004-10-15)