

慢性应激对小鼠行为和免疫功能的影响

卢莉¹, 李敏芳²

(1.山西医科大学,山西 太原 030001;2.山西医科大第二医院,山西 太原 030001)

【摘要】 目的:探讨慢性应激对小鼠行为和免疫功能的影响。方法:采用束缚制动的方法建立小鼠慢性心理应激模型,通过旷场行为实验检测各组小鼠的行为变化;并处死小鼠检测其血清 IFN- γ 和 IL-4 的水平,观察应激对小鼠免疫功能的影响。结果:应激组小鼠在旷场实验中的潜伏期显著延长,探究活动减少及粪便次数增多;IFN- γ 、IL-4/IFN- γ 比值明显下降,而 IL-4 水平无显著性差异。结论:慢性心理应激可导致小鼠行为的改变并抑制小鼠的免疫功能。

【关键词】 慢性应激;旷场行为;免疫;细胞因子

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2009)03-0370-02

Effect of Chronic Stress on Behaviors and Immunological Function in Mice

LU Li, LI Min-fang

Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 **Objective:** To observe the effect of chronic psychological stress on change of behaviors and immunological function in mice. **Methods:** A stress mode was built by restrained stress. Behavior change was evaluated, and the levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukine-4 (IL-4) and the ratio of IL-4/IFN- γ in serum were measured. **Results:** Compared with the control group, restrained mice had apparently longer latency time, the exploring behavior was decreased, and times of defecation was increased. The levels of IFN- γ and the ratio IL-4/IFN- γ decreased significantly after chronic psychological stress, whereas Thymus index and IL-4 level did not change significantly. **Conclusion:** It is showed that chronic psychological stress may induce behavior changes and aggravate the suppression of immunity in mice.

【Key words】 Psychological stress; Behavior; Immunity; Cytokine

应激对行为和免疫功能的影响一直受到许多学者的关注。过强持久的应激可使机体免疫功能低下,也影响神经系统中与行为相关的神经元形态和功能,导致动物行为异常^[1]。根据分泌细胞因子和功能的不同,CD4+T 细胞分为 Th1 和 Th2 两个亚型。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α , 通过激活细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)、NK 和巨噬细胞增强免疫功能;Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-10 和 IL-6 等,主要介导体液免疫反应,促进 B 细胞生长、活化和分化,促进 Ig 的生成和类型转换,从而实现对体液免疫应答的正向调节作用^[2]。两类细胞因子的相互调整、相互抑制的平衡状态使机体在抵御病原侵袭和保持免疫内环境的稳定方面保持协调和平衡。一旦平衡失调将引起机体的病理反应,导致疾病的产生。本研究将为小鼠建立经典的束缚应激模型,通过探讨慢性心理应激对小鼠行为的影响和血清中 IFN- γ 和 IL-4 的水平及 Th1 和 Th2 细胞的失衡状况,进一步揭示心理应激对免疫功能的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康清洁级 8~10 周龄 BALB/c 小鼠 40 只,雌雄各半,体重 24 ± 2 g,购自山

西医科大学微生物室。饲养小鼠的实验室室内温度 $21 \sim 23^\circ\text{C}$ 和湿度 50% 左右,每天循环室内光/暗周期为 12h/12h(光照时间 08:00~20:00),适应性饲养 1 周。所有动物自由摄食和饮水。按随机数字表配入四组,对照组、5 天(d)应激组、10d 应激组、15d 应激组,每组 10 只。

1.1.2 主要试剂与设备 旷场实验箱 参考有关文献自制^[3],本试验所用开阔箱为正方形,高 20cm、长 45cm、宽 45cm,周壁为黑色,上面敞开,底面分成面积相等的 25 块,沿墙格称外周格,其余为中央格。小鼠血清 IL-4、TNF- γ ELISA 试剂盒,购自深圳晶华公司(进口分装)。自动酶标监测仪, ZS-2,北京航宇浪琴医疗设备有限公司。

1.1.3 造模方法 根据文献^[4]自制的束缚筒。束缚筒用 50ml 的注射器改装,筒壁上的不同部位钻有直径 3mm 的小孔,可以让小鼠自由呼吸,筒壁从尾向头剪掉 5mm 宽,70mm 长的一条缺口,有助于小鼠顺利进入筒内。应激组小鼠接受束缚应激,6h/d。在复制模型时,须注意调整动物的活动空间,不能造成对动物的躯体伤害。每次开始束缚的时间不同,可以加大动物的心理反应。在制动期间禁食,禁水。造模结束后实验小鼠与正常小鼠在清醒、安静的状态下分批进行实验与处死。

1.2 检测指标以及方法

1.2.1 旷场实验^[5] 操作者将动物放在旷场实验箱的中央格后开始计时,摄像机全程记录小鼠在 3min 内的行为举动。主要观察中央格停留的时间指小鼠被放入中央格至其三爪跨离该格的时间;穿格次数指三爪以上跨入临格的次数;理毛修饰次数指前肢向上抬举、抓痒、洗脸、舔足的次数及粪便次数,每次实验后将粪便清除干净。行为评定采用盲法,请 3 位观察者观看录像评分,3 人一致性 >0.95。

1.2.2 细胞因子的检测 IL-4 水平的检测:按试剂盒说明进行,在抗 IL-4 单克隆抗体包被的酶标板上,分别加入标本及不同浓度的标准品(100ul/孔),室温 30-25℃ 孵育 120 分钟,洗板 9 次,加入辣根过氧化物酶标记的抗 IL-4 单克隆抗体(100ul/孔),室温孵育 60 分钟,洗板 9 次,加显色剂,避光室温 10-30 分钟,加终止液,混匀,5 分钟内用酶标仪测光密度值,绘制标准曲线,查出标本浓度。IFN- γ 水平的检测按试剂盒说明进行,基本同上。

1.2.3 统计方法 采用 SPSS11.5 进行统计分析。

2 结 果

2.1 心理应激对小鼠旷场行为的影响

结果显示,与正常对照比较,应激组的中央格停留时间显著延长 ($P<0.01$),穿格次数明显减少 ($P<0.01$),粪便次数显著增多 ($P<0.01$)。其中 15d 应激组的中央格停留时间,粪便次数高于 5d 应激组 ($P<0.05$),穿格次数也显著少于 5d 应激组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 旷场实验结果($\bar{x}\pm s$)

	中央格停留时间/秒	穿格数/格	修饰/次	粪便/次
对照组	3.01 \pm 1.82	170.55 \pm 43.3	2.91 \pm 0.9	0.77 \pm 0.4
5d 应激组	5.90 \pm 2.83**	116.50 \pm 33.1*	2.94 \pm 0.85	2.78 \pm 1.61*#
10d 应激组	8.12 \pm 2.52**	103.61 \pm 26.2**	3.12 \pm 0.9	5.10 \pm 1.4**
15d 应激组	11.80 \pm 3.33**	94.83 \pm 26.1**	5.04 \pm 1.6	5.30 \pm 1.75**

注:与对照比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$,下同;与 15d 应激组比较 * $P<0.05$

表 2 各组小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 含量
IL-4/IFN- γ 的变化 (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	N	IFN- γ	IL-4	IL-4/IFN- γ
对照组	10	85.83 \pm 5.83	16.93 \pm 2.62	0.20 \pm 0.03
5d 应激组	10	65.32 \pm 13.26*	18.52 \pm 3.45	0.30 \pm 0.05*
10d 应激组	10	63.29 \pm 8.72**	19.41 \pm 3.53	0.31 \pm 0.07**
15d 应激组	10	58.80 \pm 7.55**	21.07 \pm 5.08	0.32 \pm 0.01**

2.2 小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-4 含量及 IL-4/IFN- γ 的变化

与正常对照相比,5d 应激组血清中的 IFN- γ 明显降低 ($P<0.05$),且随着应激的时间的延长而显著下降 ($P<0.01$)。应激组血清中的 IL-4 的水平与对照无

显著差异 ($P>0.05$),IL-4/IFN- γ 的比值明显高于对照 ($P<0.05$),Th 细胞向 Th2 偏移。见表 2。

3 讨 论

旷场实验是一个用动物的行为指标来检测类于人的复杂情绪如焦虑、抑郁等的经典实验^[5]。旷场实验的中央格停留时间反映动物对环境的认知能力,正常动物会避开空旷的环境,迅速离开中央格。对于啮齿动物来说,中央环境比外周更具有危险性。本实验中,应激组的小鼠在中央格停留时间显著延长,与正常对照比较有显著差异。应激组间,15d 比 5d 应激组离开中央格的时间更长,说明应激后小鼠的空间认知能力下降,而应激时间越长,认知能力下降越显著。实验中小鼠的穿格、修饰次数呈逐渐递减趋势,说明应激后小鼠对周围环境失去兴趣,探究活动减弱,行为活动受到明显抑制且抑制程度与应激的时间有关,这与其它模型研究的结果相一致^[6-8]。同时,本实验还观察到粪便次数显著高于正常组,表明应激后小鼠的紧张焦虑的程度增强。提示慢性心理应激某种程度上导致了小鼠产生一种类焦虑、抑郁的负性情绪效应。

在实验中我们观察到,慢性应激组体内 Th1、Th2 细胞平衡被破坏,5d 应激组的小鼠血清中 IFN- γ 含量明显降低,且随着应激时间的延长,10,15d 应激组 IFN- γ 的含量也在逐步下降,以往的实验也表明,应激可使动物血中干扰素的水平下降,还可影响细胞产生 IFN- γ 的能力下降,这种下降程度与应激的程度成正比。Th2 类细胞因子 IL-4 具有多种生物学效应,在 T 细胞 B 细胞巨噬细胞的增殖分化及功能调控方面起到重要作用,实验结果显示,血清中 IL-4 与对照组虽无显著差异,但它的水平有上升趋势,与 Iwakabe 报道的一致^[9]。有研究证实,IL-4 在体内的增减,除了影响 Th1 型细胞因子分泌,并可直接导致体内整个 Th2 细胞因子发生相应的变化^[10]。束缚应激虽不能使 IL-4 的含量显著增加,但通过 IFN- γ 水平的降低导致 Th1/Th2 平衡向 Th2 细胞偏移,从而降低机体的细胞免疫功能,说明心理应激反应抑制细胞免疫的不同成分,不是简单的对免疫系统抑制,而是诱导 Th1/Th2 细胞因子平衡倾向于 Th2 细胞因子的产生。

参 考 文 献

- 1 马虹,田若平,陈起盛,等.不同应激强度对小鼠衰老进程影响差异的研究.中国行为医学科学,1998,7(1):11
- 2 龚非力.医学免疫学.北京:科学出版社,2004.61-82

(下转第 369 页)

以获得理解和帮助,往往通过再次吸食毒品暂时摆脱心理上的不愉快感,回避现实。同时社会支持水平也被认为是情绪的一个调节变量,低水平的社会支持无疑对 MMT 者负性情绪有一定的相互影响^[10]。

在应对方式上,MMT 组相对较少采用“解决问题”和“求助”等成熟的应付方式,反映出在行为方式上具有消极被动的人格特征,对自己处理问题的能力和依靠外界的帮助缺乏信心,也可能与支持系统的不完善有一定关联。

参 考 文 献

- 1 Cami J, Farre M. Drug Addiction. The New England Journal of Medicine, 2003, 349(10): 975-986
- 2 Joseph H, Staneliff S, Langrod J. Methadone maintenance treatment(MMT): A review of historical and clinical issues. Mount Sinai Journal of Medicine, 2000, 67(5-6): 347-364
- 3 Ward J, Hall W, Mattick RP. Role of methadone treatment in opiod dependence. Lancet, 1999, 353(9148): 221-226
- 4 National consensus development panel on effective medi-

(上接第 364 页)

- 10 Wayne CN. Confronting subtle emotional abuse in classrooms. Guidance and Counseling, 2002, 17(2): 32-37
- 11 向秀英, 邓云龙. 国外儿童心理虐待研究. 中国临床心理学杂志, 2008, 16(1): 43-45
- 12 Schaefer CC. Defining verbal abuse of children: A survey. Psychol Rep, 1997, 80: 626
- 13 Benbenishty R, Zeira A, Astor RA. Children reports of emotional, physical and sexual maltreatment by educational staff in Israel. Child Abuse and Neglect, 2002, 26: 763-782
- 14 Mara B, Brigitte W. Verbal abuse by the teacher during childhood and academic, behavioral, and emotional adjustment in young adulthood. Journal of Educational Psychology, 2007, 99(1): 26-38
- 15 杨世昌, 杜爱玲, 张亚林. 国内儿童受虐状况研究. 中国临床心理学杂志, 2007, 5: 552-554

(上接第 371 页)

- 3 Rowsey PJ, Yang YL, Gordon CJ. Peripheral cholinergic pathway modulates hyperthermia induced by stress in rats exposed to open-field stress. J Appl Physiol, 2002, 92: 789-794
- 4 McGivern RF, Rittenhouse P, Aird F, et al. Inhibition of the stress-induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat by prepro thyrotropin releasing hormone 178-199. J Neuro, 1997, 17(12): 4886-4894
- 5 Lipkind D, Sakov A, Kafkafi N, et al. New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. J Appl Physiol, 2004, 97: 347-359
- 6 Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 73: 193-207

caltreatment of opiate addiction. Effective medical treatment of opiate addiction. Journal of The American Medical Association, 1998, 280(22): 1936-1943

- 5 Magnra S, Nwakeze PC, Demsky SD. Pre and intreatment predictors of retention in methadone treatment using survival analysis. Addiction, 1998, 93(1): 57-60
- 6 刘建波, 地力夏提·亚合甫, 李凡. 海洛因成瘾者焦虑、抑郁情绪与艾滋病. 中国行为医学科学, 2006, 15: 1001-1002
- 7 汪向东, 王希林, 马弘. 北京: 心理卫生评定量表手册. 增订版. 中国心理卫生杂志, 1999
- 8 罗健, 张存敏, 杨国纲, 等. 社区海洛因依赖者美沙酮维持治疗的效果评估. 中国药物依赖性杂志, 2006, 15(6): 460-463
- 9 李武, 郝伟, 胡春风, 等. 男性海洛因依赖者认知功能及相关因素研究. 中国临床心理学杂志, 2007, 15(2): 152-155
- 10 唐海波, 蒲唯丹, 姚树桥. 社会支持与依恋的关系研究综述. 中国临床心理学杂志, 2008, 16(15): 551-553

(收稿日期: 2008-11-11)

- 16 Bendgen M, Wanner B, Morin AJS, Vitaro F. Relations with parents and with peers, temperament, and trajectories of depressed mood during early adolescence. J Abnorm Child Psychol, 2005, 33: 579-594
- 17 Almon S. The nature, extent and effects of emotional abuse on primary school pupil by teachers in Zimbabwe. Child Abuse and Neglect, 2002, 26: 783-791
- 18 Anna P. School stress, teachers' abusive behaviors, and children's coping strategies. Child Abuse and Neglect, 2000, 24: 1443-1449
- 19 向秀英, 邓云龙. 儿童心理虐待及其不良影响. 中国教育月刊, 2007, 2: 42-44
- 20 Tattum D. A whole-school response: From crisis management to prevention. Irish Journal of Psychology, 1997, 18: 221-232

(收稿日期: 2008-12-20)

- 7 Umriukhin EA, Dzhebranlova TD, Korobeinikova II, et al. Energy metabolism and spectral characteristics of EEG in students with different degrees of neurosis and anxiety in exam stress situations. Behav Med, 2002, 28(2): 49-52
- 8 彭敏, 姚树桥, 程明, 等. 热休克蛋白抑制慢性心理应激引起的焦虑样行为增加. 中国临床心理学杂志, 2006, 14(6): 655-658
- 9 Iwakab Lucey DR, Clerci M, Shearer GM. Type1 and Type2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. Clin Microbiol Rev, 1996, 9: 532-562
- 10 Shimada M, Ohta A, et al. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. Immunol Lett, 1998, 62: 39-43

(收稿日期: 2008-10-27)