

· 基础研究 ·

高压氧处理对慢性束缚大鼠行为学 and 海马区糖皮质激素受体的影响

麦乃铿 杨晨 孙瑞佼 吕艳 赵津京 潘树义

【摘要】目的 观察高压氧(HBO)处理和慢性束缚对大鼠行为学及海马区糖皮质激素受体(GR)表达水平的影响,探讨 HBO 对慢性束缚大鼠的干预作用。**方法** 将 60 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分成单纯束缚组、单纯 HBO 组、HBO 联合束缚组和空白对照组,每组 15 只。单纯束缚组给予行为限制 3 h/d,共 21 d;单纯 HBO 组给予 2.0 ATA HBO 治疗每日 1 次,共 21 d;HBO 联合束缚组,每日先后给予 HBO 处理和束缚处理,共 21 d;空白对照组单纯饲养 21 d,不做任何干预处理。分别于第 1 天、第 11 天和第 21 天,观察大鼠旷场试验中运动能力(水平得分)及探索行为(垂直得分)的变化,检测第 21 天海马区 GR 的表达水平。**结果** 旷场试验显示,干预第 11 天,单纯束缚组的水平得分 $[(131.0 \pm 20.6) \text{分}]$ 和垂直得分 $[(26.5 \pm 4.6) \text{分}]$ 均较空白对照组明显升高($P < 0.05$);与单纯束缚组比较,HBO 联合束缚组在第 1 天到第 11 天的得分升幅减小($P < 0.05$)。免疫组织荧光染色显示,单纯束缚组海马区 GR 表达 $[(0.2187 \pm 0.0184) \text{ \%}]$ 较空白对照组 $[(0.2203 \pm 0.0140) \text{ \%}]$ 显著减少($P < 0.01$),HBO 联合束缚组与空白对照组比较,差异无明统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 慢性束缚导致大鼠行为能力改变和海马区 GR 表达减少,HBO 能够减轻慢性束缚对大鼠行为学 and 海马区 GR 表达的影响。

【关键词】 慢性应激; 高压氧; 慢性束缚; 旷场试验; 受体,糖皮质激素

Effects of hyperbaric oxygen treatment on glucocorticoid receptor expression in the hippocampus and on the behavior of rats under chronic restraint stress Mai Naikeng*, Yang Chen, Sun Ruijiao, Lu Yan, Zhao Jinjing, Pan Shuyi. * Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
Corresponding author: Pan Shuyi, Email: psy9992011@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of hyperbaric oxygen treatment on chronic stress and glucocorticoid receptor (GR) expression in the hippocampus. **Methods** A total of 60 male Wistar rats were randomly divided into a restraint group, an HBO (hyperbaric oxygen) group, an HBO-restraint group and a control group using a random number table, each group with 15 animals. All the rats in the restraint and HBO groups were constrained by immobilizing their fore- and hind-limbs on a self-made frame for 3h daily for 21 days, and those in the HBO group received HBO treatment once daily for the same 21 days. The HBO-restraint group was immobilized in the morning and treated with HBO in the afternoon. The control group was reared without any special intervention. On the 1st, 11th and 21st day of treatment, rats from the different groups were assessed using the open field test. On the 21st day, all the animals were sacrificed and their brains were harvested to detect GR expression. **Results** In the open field test on the 11th day, the restraint group scored (131.0 ± 20.6) in terms of motor level and (26.5 ± 4.6) for exploratory behavior, both significantly higher than before restraint and significantly higher than those in the HBO-restraint group at the same time point. Immunofluorescence assay showed that GR expression in the hippocampus of the restraint group was significantly decreased compared with the control group. There was no significant difference, however, between the HBO-restraint group and the control group. **Conclusion** Chronic restraint stress induces changes in behavior and GR expression in rats which can be alleviated by hypbaric oxygen treatment.

【Key words】 Chronic stress; Hyperbaric oxygenation; Chronic restraint; Open-field test; Receptors, glucocorticoid

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.02.003

基金项目:海军后勤科研计划(CHJ12J026)

作者单位:510515 广州,南方医科大学第三临床医学院(麦乃铿);海军总医院高压氧科(潘树义、杨晨、孙瑞佼、吕艳);北京解放军 305 医院神经内科(赵津京)

通信作者:潘树义,Email:psy9992011@163.com

慢性应激指的是机体长时间持续或间断暴露于应激源中的状态,在人群中一般指长期承受生活及工作上的压力;它的致病过程主要是相关脑区的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达下降^[1]以及病态行为^[2]的出现;它是多种心理疾病,如抑郁症及创伤后应激障碍的病因之一^[3-4]。临床上高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)处理对患者机体压力具有缓解作用,本研究通过观察 HBO 处理对慢性束缚大鼠的行为学及海马 GR 表达的影响,旨在探讨 HBO 干预慢性应激的可行性。

材料与方法

一、实验动物、主要器材及试剂

选取 8 月龄健康雄性 Wistar 大鼠 60 只(购自军事医学科学院实验动物中心),体重 200 ~ 250 g,大鼠分笼饲养,每笼 5 只,均给予自由进食饮水,饲养室内温度及湿度分别恒定于 25 ~ 28 ℃ 和 50% ~ 60%, 12 h/d 光照,垫料隔日更换。实验前适应性饲养 1 周。

HBO 治疗设备:宁波高压氧舱总厂生产的单人医用高压纯氧舱(型号 NG90 III B),氧气由海军总医院中心气站提供。旷场试验材料:旷场环境 100 cm × 100 cm,高 35 cm,内侧及底部涂黑,底部分成 20 cm × 20 cm 小格,共 25 个。旷场上方 1 m 处设有照明用 500 W 光源及摄像头。免疫组织荧光材料:大鼠 GR 的单克隆抗体一抗(Abcam 公司),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗兔 IgG 二抗(Santa Cruz 公司)。

二、动物实验分组及处理方案

60 只大鼠按随机数字表法分成单纯束缚组、单纯 HBO 组、HBO 联合束缚组及空白对照组,每组 15 只。单纯束缚组:束缚处理按照 Chen 等^[5]的处理方案,利用木制的固定架,以工业用塑料捆扎带固定大鼠肩胛区及双髻,保证大鼠四肢悬空且束缚不影响呼吸,每次活动限制性束缚 3 h,束缚期间禁食及禁水,每日 1 次,共 21 d。单纯 HBO 组:HBO 处理方案为纯氧洗舱 10 min,加压 15 min 至 2.0 ATA,稳压维持 60 min,期间持续纯氧通风,氧流量维持 5 L/min 舱内氧浓度在 95% 以上,舱内温度在 20 ~ 25 ℃,随后减压 10 min 至 1.0 ATA,每日 1 次,共 21 d。HBO 联合束缚组:每日上午 9:00 开始给予 HBO 处理,下午 15:00 给予束缚处理,共 21 d。空白对照组:单纯饲养 21 d,不做任何干预处理。

三、观察指标

1. 行为学观察:采用旷场试验评价动物的运动能力及探索行为,60 只大鼠分别于第 1 天处理前(第 1 天),第 11 天处理前(第 11 天)及第 21 天处理后(第

21 天)行旷场试验。按照 Deacon 等^[6]的描述操作,利用自发活动视频分析系统记录大鼠 5 min 旷场内跨越方格个数(水平得分)和站立次数(垂直得分),规定大鼠每跨越 1 格(两前肢与至少一后肢同时进入方格内)得 1 分;每出现 1 次两前肢完全离开地面只靠后肢站立得 1 分。每次试验前用清水消除实验大鼠气味。

2. GR 表达检测:60 只大鼠完成 21 d 的处理方案后单纯饲养 24 h,于次日上午给予 20% 乌拉坦 0.7 ml/100 g 腹腔注射麻醉后灌注取脑,置于金属小盒中,液氮速冻 20 s。冰冻切片机上切片,厚度 30 μm,采用免疫组织荧光法分析大鼠海马组织 GR 表达情况,操作参照 Zhang 等^[7]实验进行。每张切片随机选取细胞分布均匀的视野,利用 Image-Pro Plus 6.0 测定平均单位面积的绿色荧光强度光密度(optical density, OD)值,反映 GR 表达水平。

四、统计学方法

使用 SPSS 13.0 版统计软件进行统计学分析处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,利用估计邻域法^[8]排除实验数据中的第 1 天旷场试验得分中的特异值,其中单纯束缚组排除 3 个样本,单纯 HBO 组排除 2 个样本。4 组大鼠在连续时间点上行为学的差异比较采用重复测量的方差分析;HBO 处理及束缚处理对大鼠 GR 表达的影响采用两因素析因分析设计资料的方差分析;组间两两比较采用 LSD-t 法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠旷场试验得分比较

处理前后大鼠水平得分和垂直得分的差异均有统计学意义($P < 0.01$);不同分组的组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。干预第 11 天,与单纯 HBO 组比较,单纯束缚组和 HBO 联合束缚组的水平和垂直得分明显升高($P < 0.05$);与空白对照组比较,单纯束缚组和 HBO 联合束缚组的水平和垂直得分明显升高($P < 0.05$)。与单纯束缚组比较,HBO 联合束缚组在第 1 天到第 11 天水平和垂直得分的升幅明显减少($P < 0.05$)。干预第 1 天和第 21 天,4 组间的水平及垂直得分比较,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

二、各组大鼠 GR 表达 OD 值比较

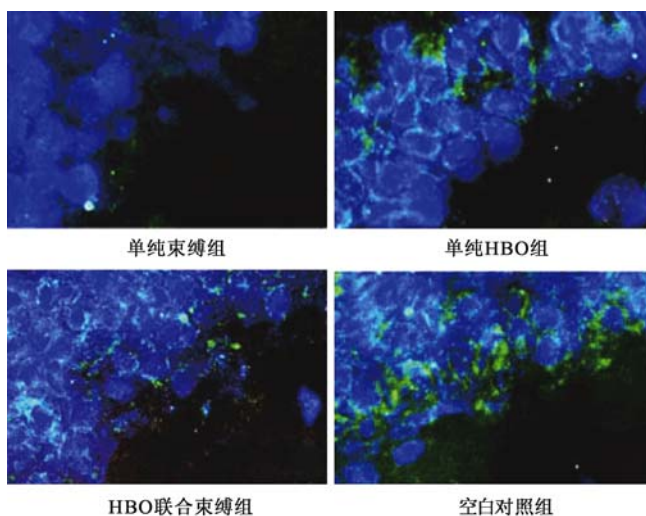
单纯束缚组、单纯 HBO 组、HBO 联合束缚组和空白对照组的海马区 GR 表达的绿色荧光强度 OD 值为(0.1591 ± 0.0190)%、(0.2204 ± 0.0295)%、(0.2187 ± 0.0184)% 和 (0.2203 ± 0.0140)%。单纯束缚组 OD 值较空白对照组明显减少($P < 0.01$),而单纯 HBO 组和 HBO 联合束缚组 OD 值分别与空白对照组比较,差

表 1 各组大鼠不同时间点的旷场试验得分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	水平得分(跨越方格个数)			垂直得分(站立次数)		
		第 1 天	第 11 天	第 21 天	第 1 天	第 11 天	第 21 天
单纯束缚组	12	97.7 $\pm$ 15.1	131.0 $\pm$ 20.6 ^{ab}	58.7 $\pm$ 33.8	20.8 $\pm$ 5.3	26.5 $\pm$ 4.6 ^{ab}	11.2 $\pm$ 6.5
单纯 HBO 组	13	103.8 $\pm$ 22.2	43.3 $\pm$ 25.3	37.8 $\pm$ 20.4	21.8 $\pm$ 4.7	12.0 $\pm$ 8.0	6.2 $\pm$ 4.8
HBO 联合束缚组	15	112.5 $\pm$ 12.1	113.7 $\pm$ 36.0 ^{ab}	40.1 $\pm$ 30.1	25.8 $\pm$ 5.1	23.6 $\pm$ 8.2 ^{ab}	7.5 $\pm$ 5.6
空白对照组	15	106.7 $\pm$ 27.5	52.8 $\pm$ 33.4	50.0 $\pm$ 29.0	23.8 $\pm$ 7.8	7.4 $\pm$ 3.6	7.8 $\pm$ 4.5

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与单纯 HBO 组比较,^b $P < 0.05$

异均无统计学意义($P > 0.05$)。与单纯束缚组比较, HBO 联合束缚组 OD 值明显增加($P < 0.01$)。HBO 处理及束缚处理两者间存在拮抗效应($P < 0.01$)。详见图 1。



注:蓝色荧光为细胞核,细胞核间绿色荧光为 GR
图 1 各组大鼠海马 GR 表达(免疫荧光染色, $\times 40$)

讨 论

慢性应激被认为是抑郁、焦虑甚至是心血管疾病的危险因素之一^[9],目前对它的研究主要围绕在致病机制上,对于 HBO 干预的相关报道极少。它的致病过程包括相关脑区 GR 下降、下丘脑-垂体-肾上腺轴负反馈障碍、循环炎症因子增多,最终导致病态行为如探索欲下降和运动减少。其中慢性束缚是一种最常用的应激模拟方案,它可以很好地重现慢性应激致病过程中所出现的海马区 GR 表达和行为学的改变^[10]。本研究通过观察 HBO 处理和慢性束缚对大鼠行为学及海马区 GR 表达的影响,发现 HBO 能够减轻慢性应激过程中行为学的改变和海马区 GR 表达的减少程度,提高机体对应激的适应程度。

行为学的变化可以反映应激的程度,如不同的束缚时间可引起旷场试验结果的差异^[11-12]。旷场试验中的水平得分(跨越方格个数)表示动物的运动能力,垂直得分(站立次数)表示动物的探索行为。本研究结果显示, HBO 处理并不影响大鼠的运动能力和探索行为。

而经过束缚处理的大鼠,在实验第 11 天的水平得分和垂直得分均出现一个明显的上升趋势,分别为由第 1 天的(97.7 $\pm$ 15.1)和(20.8 $\pm$ 5.3)分上升到第 11 天的(131.0 $\pm$ 20.6)和(26.5 $\pm$ 4.6)分,此时大鼠的运动能力及探索行为有所增加,出现兴奋性行为,处于急性应激阶段。随之下降至第 21 天的(58.7 $\pm$ 33.8)和(11.2 $\pm$ 6.5)分,此时运动能力和探索欲开始下降,出现病态行为,并进入慢性应激阶段。上述表现与经典的慢性应激理论相符^[13]。本研究显示,联合 HBO 处理后大鼠在第 1 天到第 11 天水平和垂直得分的升幅较单纯束缚减少,此时大鼠的兴奋性行为得到了抑制,表明 HBO 能减缓急性应激对机体的影响。

下丘脑-垂体-肾上腺轴负反馈障碍是慢性应激致病核心,GR 表达的下降作为它的一个中心环节^[14],已在多种类型的慢性应激动物模型中被证实^[15]。慢性应激得到缓解时,海马区 GR 表达重新上升^[16],证明了海马区 GR 的表达水平在一定程度上可以反映机体对应激的适应程度。本实验观察到束缚处理后海马区 GR 表达较空白对照组明显减少[OD 值分别为(0.1591 $\pm$ 0.0190)%和(0.2203 $\pm$ 0.0140)%],这与大多数实验所观察到的结果是一致的;束缚联合 HBO 处理后 GR 表达[OD 值为(0.2187 $\pm$ 0.0184)%]与单纯束缚组相比明显增加,说明 HBO 处理能抑制慢性束缚对海马区 GR 表达的影响,增加大鼠对慢性束缚的适应程度,同时 HBO 处理和束缚处理两因素存在拮抗关系,笔者认为,在此过程中 HBO 作为一种新类型的应激源而起作用,与 Ostrander 等^[17]的研究类似。Ostrander 等^[17]发现慢性应激的大鼠在接受新类型的刺激后出现糖皮质激素水平、ACTH 及室旁核 CRHmRNA 的下降,慢性应激的适应程度增加。结合本研究旷场试验中在束缚应激的基础上施加 HBO 处理可抑制其急性应激期行为学的变化,提示 HBO 在早期的急性应激阶段就开始抑制应激源对机体的影响,并后续介导对慢性应激适应程度的增加。

综上所述,束缚处理后的大鼠旷场试验出现明显的兴奋性行为和海马区 GR 表达的下降,符合慢性应激的特征;当联合 HBO 处理后束缚大鼠表现出兴奋性行为的抑制和海马区 GR 表达水平的相对保持,说明 HBO 能够提高机体对应激的适应程度。这就为临床上

HBO 干预慢性应激提供了一定的理论支持,但具体作用过程还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, et al. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus[J]. Neuroscience, 2003, 119(3): 887-897.
- [2] Maes M, Yirmiya R, Norberg J, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression[J]. Metab Brain Dis, 2009, 24(1): 27-53.
- [3] Auerbach RP, Admon R, Pizzagalli DA. Adolescent depression: stress and reward dysfunction[J]. Harv Rev Psychiatry, 2014, 22(3): 139-148.
- [4] Yehuda R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1179:56-69.
- [5] Chen JX, Li W, Zhao X, et al. Changes of mRNA expression of enkephalin and prodynorphin in hippocampus of rats with chronic immobilization stress[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2547-2549.
- [6] Deacon RM. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 936-946.
- [7] Zhang M, Teng H, Shi J, et al. Disruption of beta-arrestins blocks glucocorticoid receptor and severely retards lung and liver development in mice[J]. Mech Dev, 2011, 128(7-10): 368-375.
- [8] 丁旭东. 几种特异值处理方法的比较[J]. 物探化探计算技术, 1996, 18(1): 71-77.
- [9] Steptoe A, Kivimäki M. Stress and cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2012, 9(6): 360-370.
- [10] Glavin GB, Pare WP, Sandbak T, et al. Restraint stress in biomedical research: an update[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1994, 18(2): 223-249.
- [11] da Silva CC, Lazzaretti C, Fontanive T, et al. Estrogen-dependent effects on behavior, lipid-profile, and glycemic index of ovariectomized rats subjected to chronic restraint stress[J]. Behav Processes, 2014, 103:327-333.
- [12] Hennebelle M, Balasse L, Latour A, et al. Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e42142.
- [13] Rohleder N. Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems—2011 Curt Richter Award Winner[J]. Psychoneuroendocrinology, 2012, 37(3): 307-316.
- [14] Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2000, 23(5): 477-501.
- [15] Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 39(1): 112-119.
- [16] Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, et al. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? [J]. Psychoneuroendocrinology, 2011, 36(3): 415-425.
- [17] Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, et al. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress[J]. Endocrinology, 2006, 147(4): 2008-2017.

(修回日期:2014-12-10)

(本文编辑:汪 玲)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益,现将中华医学会系列杂志对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下:

1. 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部做出说明。

2. 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。

3. 请作者所在单位在来稿介绍信中注明文稿有无一稿两投问题。

4. 凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿,则表明稿件仍在处理中,作者欲投他刊,应事先与该刊编辑部联系并申述理由。

5. 编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核实后再通知作者,同时立即进行退稿处理,在做出处理决定前请作者就此问题做出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

6. 一稿两用一经证实,期刊编辑部将择期在杂志中刊出其作者姓名和单位及撤销该论文的通告;对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿,中华医学会系列杂志 2 年内将拒绝其发表;并就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社