

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01065

· 论 著 ·

早年慢性应激对青春期病理性攻击大鼠空间学习记忆及海马脑源性神经营养因子、5-羟色胺的影响

张艳¹, 雷莉¹, 胡华^{1*}, 屈远¹, 吕小娟¹, 秦光成², 陈力学²

1. 重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探索早年慢性应激对青春期病理性攻击大鼠空间学习记忆能力, 及对海马脑源性神经营养因子(BDNF)、5-羟色胺(5-HT)水平的影响。**方法** 将20只雄性、出生后21 d的Sprague-Dawley大鼠分为实验组、对照组, 每组各10只。实验组大鼠采用孤养、昼夜颠倒、非奖赏性挫败、预激惹刺激、居住-入侵攻击等多种早年持续性应激方法持续到青春期。然后采用居住-入侵攻击实验检测两组青春期大鼠的攻击性, 水迷宫实验观察其空间学习记忆能力, 运用免疫组化方法检测大鼠海马内BDNF和5-HT水平。**结果** (1)水迷宫实验, 实验组大鼠在总路程、穿越目标区域次数、逃避潜伏期3项指标上与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$), 而中心区域路程/总路程比值与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)免疫组化结果显示, 与对照组比较, 实验组大鼠海马内BDNF和5-HT免疫阳性神经元数量均减少($P < 0.05$), BDNF和5-HT表达降低。**结论** BDNF和5-HT可能参与了青春期病理性攻击大鼠海马空间学习记忆能力的调控, 并在空间学习记忆方面起着重要调控作用。

[关键词] 脑源性神经营养因子; 血清素; 攻击; 空间学习记忆; 早年慢性应激; 青春期

[中图分类号] R 749 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)10-1065-05

Effect of early life chronic stress on spatial learning and memory and hippocampus brain-derived neurotrophic factor and 5-HT in puberty pathological aggression rats

ZHANG Yan¹, LEI Li¹, HU Hua^{1*}, QU Yuan¹, LÜ Xiao-juan¹, QIN Guang-cheng², CHEN Li-xue²

1. Department of Psychiatry, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Laboratory of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of early life chronic stress on spatial learning and memory and hippocampus brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and 5-HT levels in puberty pathological aggression rats. **Methods** Twenty 21-day-old male rats were evenly randomized into 2 groups: experimental group and control group. Animals in the experimental group, from the early life till puberty, were given a series of stresses, including social isolation, reversed night and day, frustration test of non-reward, and resident intruder confrontations, etc. Resident intruder experiment was used to examine the aggressiveness of the animals; water maze experiments were performed to observe their spatial learning and memory. Immunohistochemistry method was used to test the expression of BDNF and 5-HT in the hippocampus. **Results** Morris water maze test showed that the total distance of the experimental group was significantly longer than that of the control group ($P > 0.05$), and the experimental group had significantly less crossing times of hidden platform and escape latency compared with the control group ($P < 0.05$); the ratios of central area distance/total distance were similar in the two groups. Immunohistochemistry findings showed that BDNF and 5-HT positive neurons were significantly less in the hippocampus of experimental group compared with the control group ($P < 0.05$), and hippocampal BDNF and 5-HT expression in the experimental group was decreased. **Conclusion** BDNF and 5-HT may participate in the regulation of spatial learning and memory in the puberty pathological aggression rats, and they may play an important regulating role in spatial learning and memory.

[收稿日期] 2013-03-26

[接受日期] 2013-06-09

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC, 2011jjA10104), 重庆医科大学国家自然科学基金预研资助项目(NSFY201111). Supported by Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC, 2011jjA10104), and Pilot Natural Science Foundation of Chongqing Medical University (NSFY201111).

[作者简介] 张艳, 硕士. E-mail: 244953625@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012866, E-mail: huhuateam@hotmail.com

[Key words] brain-derived neurotrophic factor; serotonin; aggression; spatial learning and memory; early life chronic stress; puberty

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10): 1165-1069]

攻击行为指有目的、有意图的伤害他人心理或身体状况及破坏其他目标的行为。暴力行为是攻击行为的一种特殊类型或极端形式,它属于病理性攻击。病理性攻击(又称异常攻击)被定义为由于心理、社会与生物因素所导致的心理障碍或心理疾病所产生的对他人、物体与社会规范的侵犯行为^[1]。目前对人类^[2]和动物^[3]的研究均已证明早年应激可增加攻击行为及异常冲动情绪。研究显示,慢性应激对情绪(焦虑、抑郁)和学习记忆功能有一定损害作用^[4],早年遭受暴力行为的青少年明显存在学习记忆功能障碍^[5]。

脑内5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是与认知功能密切相关的神经递质。目前有研究显示,海马能接受BDNF、5-HT等神经纤维投射,并发出神经纤维投射到额叶皮质、杏仁核等与情感有关的脑区,因此它不仅是应激反应的重要调节中枢,也是调节情绪与认知的重要脑区^[6]。应激可导致认知能力改变^[4],但早年慢性应激所致青春期病理性攻击者认知功能尤其空间学习记忆功能改变与BDNF、5-HT的关系国内外迄今少有报道。为此本研究通过探索早年慢性应激对青春期病理性攻击大鼠海马内BDNF、5-HT含量及空间学习记忆的影响,以期提高对青春期病理性攻击者学习记忆功能障碍神经突触可塑性的认识,并为未来相关机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性健康 Sprague Dawley(SD)大鼠30只(出生后21 d,体质量40~60g),清洁级,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心。随机分为对照组(10只)和实验组(10只),其余10只作为居住-入侵实验的工具(入侵鼠)。3组大鼠之间体质量差异无统计学意义($P>0.05$),对照组和入侵鼠分笼群居喂养(每笼5只,每组2笼),实验组每只大鼠使用小笼单独喂养。饮食和饮水自由,自然昼夜周期光照,标准温度和湿度。

1.2 实验材料 行为学测试仪器:Morris水迷宫及水迷宫记录分析系统(中国医学科学院药物研究所研制),Morris水迷宫为圆柱形不锈钢制桶,直径

165 cm,高70 cm,平台为高50 cm、直径35 cm的黑色柱形树脂。

1.3 早年应激方法

1.3.1 早年孤养 实验组于断奶后第21天开始进行孤养,持续5周,提供正常条件的食物、温度、湿度。

1.3.2 昼夜颠倒 自第21天之后实验组每日进行昼夜颠倒(每日8:00~20:00遮蔽光照,20:00~8:00进行光照),共5周。

1.3.3 非奖赏性挫败实验 孤养2周后开始每天给予2%蔗糖水,自3周起,每次攻击实验前蔗糖水浓度降至1%。

1.3.4 预激惹刺激及居住入侵实验 自孤养第3周起每天将入侵鼠单独放入居住鼠笼内,于笼子正中用一铁丝网将入侵鼠与居住鼠隔开,用蔗糖水喂食入侵鼠,预激惹居住鼠5 min,随即将铁丝网取出,开始进行一次10 min的居住-入侵攻击实验。每天1次,连续3周,反复进行用以增加应激。

1.4 行为学测试

1.4.1 居住-入侵实验 实验组和对照组于第5周后进行一次10 min居住-入侵实验,记录大鼠的攻击行为,行为评定采用盲法,由2名观察者观看录像后进行评估,取其平均值。大鼠攻击行为表现为:(1)攻击性理毛行为;(2)攻击性追逐行为;(3)嘶咬;(4)攀压,等等。

动物暴力行为被认为是一种增强的、病理的和异常的攻击形式,定量标准为较短的攻击潜伏期、持续和频繁的攻击嘶咬^[7],而定性标准则体现为对于对方要害部位(头/腹/喉)的攻击^[8]和独立于环境的攻击(攻击时忽视对方的性别、状态和环境)以及攻击之前缺乏仪式行为(通过攻击/威胁比例来测量)^[9]。

一般认为与对照组相比有以下行为之一可视为动物有暴力攻击行为^[10],即病理性攻击行为:(1)第1次攻击潜伏期显著缩短;(2)攻击/威胁比例显著升高;(3)对脆弱部位(头、腹部和喉部)进行攻击;(4)严重的攻击后果(出血、受伤或死亡);(5)对手屈服后继续攻击;(6)忽视对手状况(活动/静止/死亡)和环境(居住笼/中性环境)进行攻击。

1.4.2 Morris水迷宫实验 应用Morris水迷宫测

试实验组和对照组大鼠的空间学习记忆情况,依次进行训练并进行空间探索实验。(1)训练,于居住-入侵实验后 1 d 进行。水桶周围放置特殊标记物作为大鼠的视觉视线索,水池内注入自来水,水面超过平台 1.5 cm,水温恒定在(25±1.0)℃。训练前 1 d 不放置平台,让大鼠自由游泳 5 min 适应环境,不记录轨迹。正式训练的第 1 天将平台固定在 SE 象限,位于水面下 1.5 cm,实验室中的物品和人员的位置在实验期间固定不变,作为大鼠的空间参照物。每次从随机象限入水点将大鼠面向池壁轻轻放入水中,检测时间为 60 s,让其找到水中隐藏平台。大鼠爬上平台后,让其停留 30 s;如果入水后给定时间未能找到平台或者未能爬上平台,则记录为总时间 60 s,并人为放置于平台上 30 s,然后从平台上取下休息 30 s,再进行下一次实验。每只大鼠每天实验 4 次,连续训练 5 d。(2)空间探索实验,第 6 d 移除平台,随机选择象限作为入水象限,记录大鼠在 60 s 内运动总路程、中心区域流程、穿越目标区域次数和逃避潜伏期。

1.5 脑组织标本采集 最后一次刺激 24 h 后,大鼠腹腔内注射 10%水合氯醛(100 mg/kg)麻醉,经左心室依次灌注生理盐水(4℃)150 mL 快速灌注冲洗血液(压力为 100~200 mmHg,1 mmHg=0.133 kPa),随后用新鲜配置的 4%多聚甲醛缓冲液(4℃,pH 7.4)500 mL,以先快后慢的原则灌注固定 30 min,迅速开颅取脑组织,根据大鼠脑立体定位图谱,取含海马的脑组织(冠状切面)。经脱水、透明、浸蜡、铸块常规制成石蜡块,石蜡切片厚度 5 μm,用于

免疫组化测定。

1.6 脑组织 BDNF 免疫组化染色 使用北京中杉分装 BDNF(SC-20981)、boster 分装 5-HT(BAO121)试剂盒,检测对照组和实验组大鼠海马内 BDNF 及 5-HT 神经元的含量。详细步骤如下:石蜡切片常规脱蜡脱水,0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)热修复 10 min,滴加正常山羊血清封闭液(室温 20 min),一抗 4℃过夜。滴加生物素标记山羊抗兔二抗 IgG(Invitrogen 862150A)37℃反应 30 min,DAB 显色(室温),显微镜下控制显色程度,直到目标产物显现棕黄色,背景呈浅棕色。苏木精复染,显微镜(奥林巴斯 6A14938)观察,照相。每组大鼠共 10 只,每只取 10 张切片,每个部位选择 5 个视野,通过 Image-Pro Plus 6.0 软件对切片进行分析,计算平均光密度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 早年慢性应激后青春期病理性攻击动物模型构建 参照本课题组前期工作^[11],我们成功构建了早年慢性应激后青春期大鼠病理性攻击模型。

2.2 空间学习记忆能力 与对照组比较,实验组大鼠运动总路程增加、穿越目标区域次数减少、逃避潜伏期缩短,3 项指标的差异具有统计学意义($P < 0.05$),中心区域路程/总路程比值差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 大鼠水迷宫实验结果比较

Tab 1 Comparison of experimental results in Morris water maze test

Group	Total distance l/cm	Central area distance/ total distance (%)	Number of crossing times	Escape latency t/s
Experimental	1 805.00±223.23*	23.72±6.73	1.48±1.09*	13.15±12.65*
Control	1 681.55±326.72	24.02±8.22	1.94±1.16	19.04±14.94

$n=10, \bar{x} \pm s$

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 大鼠海马 BDNF 与 5-HT 免疫组化结果 正常对照组海马 BDNF 阳性细胞表达较强,着色深,细胞排列整齐,细胞形态正常(图 1B);实验组大鼠海马 BDNF 阳性细胞数量明显减少,细胞着色浅淡、稀疏,细胞排列杂乱(图 1A)。对照组 5-HT 免

疫阳性神经元呈卵圆形、圆形或多角形(图 1D),实验组大鼠海马 5-HT 阳性神经元较对照组数量明显减少,细胞稀疏(图 1C)。免疫组化检测结果显示,实验组大鼠海马内 BDNF 和 5-HT 免疫阳性神经元平均光密度值均较对照组降低($P < 0.05$,表 2)。

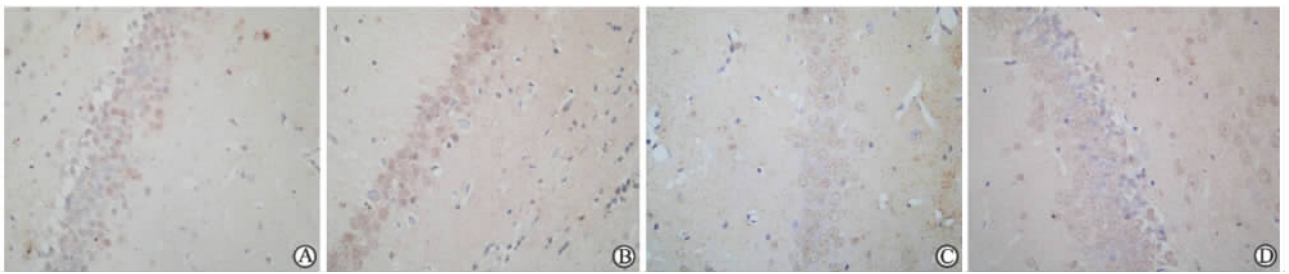


图 1 大鼠海马 BDNF 和 5-HT 免疫组化结果(S-P 法)

Fig 1 Immunohistochemistry results of BDNF and 5-HT in rat hippocampus(S-P staining)

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; 5-HT: 5-hydroxytryptamine. A: BDNF expression in experimental group; B: BDNF expression in control group; C: 5-HT expression in experimental group; D: 5-HT expression in control group. Original magnification: $\times 200$

表 2 大鼠海马内 BDNF 和 5-HT 水平的比较

Tab 2 Comparison of hippocampal BDNF and 5-HT levels between two groups

$n=10, \bar{x} \pm s$

Group	The average optical density of BDNF	The average optical density of 5-HT
Experimental	0.140 5 \pm 0.003 1*	0.114 6 \pm 0.003 9*
Control	0.149 5 \pm 0.003 1	0.131 2 \pm 0.003 9

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; 5-HT: 5-hydroxytryptamine. * $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

早年应激对情绪、学习记忆^[12]等重塑有重要意义。海马是调节情绪的重要脑区,也是应激损伤的主要易感部位^[13]。

学习记忆功能是大脑最高级的功能,是人们成功完成各项活动最重要的条件。本研究结果显示,早年通过多种形式应激后青春期大鼠出现病理性攻击行为,同时空间学习记忆水平低于对照组(运动总路程高于对照组,穿越目标区域次数、逃避潜伏期均低于对照组, $P < 0.05$)。目前大量研究证据表明应激可明显影响大鼠空间学习记忆能力^[14],并且空间记忆障碍的儿童在焦虑、强迫及攻击性方面显著高于正常儿童,提示儿童情绪障碍和攻击行为可能与空间学习记忆缺陷相关^[15]。因此推断早年慢性应激后的青春期大鼠病理性攻击行为可能与空间学习记忆能力障碍有关,但其相关机制仍需进一步探索。

本研究结果显示,由慢性多种应激构建的青春期病理性攻击大鼠海马内 BDNF 水平较对照组降低。海马是学习记忆的关键部位, BDNF 广泛分布于海马、前额叶皮质等脑区,影响神经元活性并且参

与突触重塑^[16]。Chan 等^[17]条件性敲除小鼠脑内 BDNF 基因可明显增强小鼠雄性攻击行为。Sterlemann 等^[18]的研究也表明慢性应激可导致整个海马区 BDNF 表达水平明显下降,与本研究结果类似。因此,我们推测青春期的病理性攻击大鼠空间学习记忆功能障碍可能与海马内 BDNF 水平下降有关。

5-HT 被公认是在神经环路中调控攻击行为的关键性神经递质。本研究结果显示,慢性多种应激后青春期病理性攻击大鼠海马内 5-HT 水平较对照组降低。海马 5-HT 可能在海马长时程效应增强(LTP)和记忆改善中起重要作用, Mazer 等^[19]给成年大鼠脑中灌注色氨酸羟化酶抑制剂对氯苯丙氨酸以耗竭 5-HT,结果大鼠出现学习能力缺损,学习记忆能力下降的大鼠其脑内 5-HT 亦显著降低。有研究表明 5-HT 对 BDNF 基因表达起着正性调控作用,同时 BDNF 对中枢神经系统 5-HT 类神经元有促进和再生作用并参与其重塑过程,两者之间相互作用,共同参与对学习记忆的调控^[20]。因此,青春期的病理性攻击大鼠空间学习记忆功能障碍可能与海马内 5-HT 含量降低有关。我们推测海马内 BDNF 与 5-HT 间交互作用可能共同参与了青春期的病理性攻击大鼠空间学习记忆功能的调控,但其具体机制尚不清楚。

综上所述,早年慢性应激后青春期大鼠可出现病理性攻击行为、空间学习记忆损害及海马内 BDNF、5-HT 水平降低,提示早年慢性应激、青春期的病理性攻击、学习记忆能力与海马内 BDNF、5-HT 水平之间可能存在重要关系。但本研究存在一定的局限性,尚未结合基因等遗传因素的影响,仅从应激因素方面进行研究,今后将进一步结合环境因素和遗

传因素探索青春期病理性攻击行为发生的病理机制,为探索青少年暴力攻击的预防和干预措施提供实验依据。

(志谢 衷心感谢重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室的技术指导和帮助!)

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 唐平. 病理性攻击行为的心理基础及其哲学本质[J]. 医学与哲学, 2004, 25: 65-67.
- [2] Ehrensaft M K, Cohen P. Contribution of family violence to the intergenerational transmission of externalizing behavior[J]. *Prev Sci*, 2012, 13: 370-383.
- [3] Toth M, Mikics E, Tulogdi A, Aliczki M, Haller J. Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses[J]. *Horm Behav*, 2011, 60: 28-36.
- [4] Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler E J, et al. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition[J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73: 658-666.
- [5] Ziminski C E, Phillips L R, Woods D L. Raising the index of suspicion for elder abuse: cognitive impairment, falls, and injury patterns in the emergency department[J]. *Geriatr Nurs*, 2012, 33: 105-112.
- [6] Sapolsky R M. Why stress is bad for your brain[J]. *Science*, 1996, 273: 749-750.
- [7] Miczek K A, Fish E W, De Bold J F. Neurosteroids, GABA_A receptors, and escalated aggressive behavior[J]. *Horm Behav*, 2003, 44: 242-257.
- [8] Haller J, Mikics E, Halász J, Tóth M. Mechanisms differentiating normal from abnormal aggression: glucocorticoids and serotonin[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 526(1-3): 89-100.
- [9] Koolhaas J M. Hypothalamically induced intraspecific aggressive behavior in the rat[J]. *Exp Brain Res*, 1978, 32: 365-375.
- [10] de Almeida R M, Miczek K A. Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement ("frustration") in mice: inhibition by anpirtoline; a 5-HT_{1B} receptor agonist[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2002, 27: 171-181.
- [11] 屈远, 雷莉, 秦光成, 陈力学, 胡华. 青春期病理性攻击动物模型的初步构建[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2011, 20: 630-632.
- [12] Carrion V G, Wong S S. Can traumatic stress alter the brain? Understanding the implications of early trauma on brain development and learning [J]. *J Adolesc Health*, 2012, 51(2 Suppl): S23-S28.
- [13] Diamond D M, Park C R, Campbell A M, Woodson J C. Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia [J]. *Hippocampus*, 2005, 15: 1006-1025.
- [14] 韩韵, 石瑞红, 王馨佳, 谢敏, 王少辉, 廖晓梅. 慢性应激对不同性别小鼠空间认知能力的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, 27: 265-269.
- [15] 王庆雄, 静进, 蔡小梅, 刘芳梅, 邹小兵, 唐春, 等. 非言语型学习障碍儿童视觉空间认知特征与行为问题[J]. *中国心理卫生杂志*, 2005, 19: 15-18.
- [16] Edelmann E, Leßmann V, Brigadski T. Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 13: 1-18.
- [17] Chan J P, Unger T J, Byrnes J, Rios M. Examination of behavioral deficits triggered by targeting BDNF in fetal or postnatal brains of mice [J]. *Neuroscience*, 2006, 142: 49-58.
- [18] Sterlemann V, Rammes G, Wolf M, Liebl C, Ganea K, Müller MB, et al. Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice[J]. *Hippocampus*, 2010, 20: 540-549.
- [19] Mazer C, Muneyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits [J]. *Brain Res*, 1997, 760(1-2): 68-73.
- [20] Deltheil T, Guiard B P, Cerdan J, David D J, Tanaka K F, Repérant C, et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55: 1006-1014.

[本文编辑] 周燕娟