

慢性情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫反应的影响: 一个新的情绪应激模型

林文娟^{①②} 王玮雯^① 邵枫^③

(① 中国科学院心理研究所脑-行为研究中心, 北京 100101; ② 中国科学院心理健康重点实验室, 北京 100101; ③ 北京大学心理系, 北京 100871. E-mail: linwj@psych.ac.cn)

摘要 介绍一种新的情绪应激模式,即以不确定性空瓶饮水刺激作为情绪应激源,考察14 d情绪应激对大鼠行为、神经内分泌和免疫功能的影响。结果表明情绪应激诱发出明显的攻击行为,激活了HPA轴和交感神经系统,减少了特异性抗体的产生和血白细胞数目。而单纯缺水但无空瓶刺激的应激只引起探究行为、HPA轴激活和血白细胞数目降低。这些结果证明了心理行为因素对行为、内分泌和免疫功能的作用。该模型可用作拟人类的情绪应激模型(例如愤怒或焦虑),它有助于进一步研究情绪应激、行为和免疫功能间的复杂关系。

关键词 情绪应激模型 攻击行为 儿茶酚胺 糖皮质激素 免疫功能

很久以来人们就认识到应激能够影响健康状况和增加疾病(如感染性疾病、癌症、冠心病和自身免疫病)的易感性^[1-4]。目前对应激的行为和生理过程的研究主要以动物为对象。为探讨应激对不同生理过程,包括对免疫功能的影响,前人已建立了多种动物应激模型^[5,6]。这些模型按照采用的应激源的性质大致分为3类:即躯体的、社会的和心理的。迄今最常用的模型是躯体性应激模型,如束缚、噪音和电击等。尽管这些模型也含有心理应激的成分,但其主要成分是生理性的^[7]。至于心理性应激,一类是采用隔离和母子分离的手段,虽然这也可归类为一种特殊类型的心理应激,但它更属于社会应激类型^[8]。另一类是采用巴甫洛夫条件化的厌恶刺激,可控和不可控的电击应激模型^[9]。这些模型是以生理性应激为基础的学习反应,且在上述应激研究中极少使用行为和情绪指标。

情绪应激与人类疾病的易感性机制密切相关^[1]。心理应激、行为和免疫功能的关系也是当今心理神经免疫学研究的热点。为此,本研究报道一种新的情绪应激模型并探讨它对行为和生理过程的调节作用。该工作通过在程序性饮水的固定时间点给予动物空瓶刺激诱发其情绪反应,采用新异抗原卵白蛋白(ovalbumin, OVA)引起体液免疫反应,观察该情绪应激对行为、神经内分泌和免疫功能的影响。

1 材料与方法

(i) 动物。59只成年Wistar大鼠(约2月龄,体重220~250 g)单笼饲养,控制室温(20±2℃)和12 h白昼/12 h黑夜的照明(7:00~19:00照明)。除了应激期间,动物自由饮水和摄食。动物适应实验环境1周,此间每天抚摸动物(3 min/d)以减轻操作影响。适应期后,训练动物在每天的9:00~9:10和21:00~21:10定时饮水1周。每次10 min饮水时间的选择是因为观察发现动物一般持续饮水的时间是5~8 min。定时饮水训练后,所有动物腹腔注射100 μg的OVA(OVA溶于PBS加入等体积的弗氏完全佐剂乳化而成)。

(ii) 实验程序。免疫当日,动物自由分为3组:空瓶组(empty bottle, EB)、不给予空瓶组(no bottle, NB)和对照组(control, C)。EB组动物(22只)在每天2次定时饮水的时间随机给予一次空瓶刺激,持续14 d; NB组(18只)的实验程序与之相同,只是在EB组空瓶刺激的相同时间点既不给空瓶也不给水以控制饮水量的影响; C组(19只)是对照组,在所有定时饮水期自由饮水。EB和C组动物同屋饲养, NB组动物在另一房间饲养以避免C组动物饮水或EB组动物情绪应激行为对其产生心理影响。在第14天实验结束后所有动物断头处死,取血,部分血离心分离血浆和血清,同时剥离脾脏称重。

(iii) 行为分析. 每次 10 min 实验期间观察动物的行为. 行为观察包括攻击(咬或攻击空瓶和笼子)、探究(前后左右的运动和光顾水瓶所在位置)以及修饰行为(梳理皮毛和洗脸). 每种行为根据强度以 0, 1, 2, 3, 4 计分. 具体观察方法是将应激的 10 min 等分为 4 个时间段, 在每个时间段内记录每只动物上述 3 种行为, 行为出现即为 1, 否则为 0. 10 min 内 4 次观察的总分为 0~4 之间. 得分基于 2 名观察者的观察结果平均而得, 其中 1 人为双盲控制. 14 个观察日的最后 3 d 的平均分用于统计分析.

(iv) 皮质酮和儿茶酚胺(CA)水平测定. 血清中的皮质酮水平采用改进的放射免疫分析法(RIA)^[10]. 血浆中的 CA 水平采用 HPLC-ED 方法测定^[11].

(v) 抗 OVA 抗体水平的测定. 血清抗 OVA 抗体水平采用 ELISA 法测定. 用 OVA(100 μ L/孔, 1 mg/mL)包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜. 用含 Tween20 的磷酸缓冲液(0.05% Tween20, pH 7.4)洗板 2 次, 双蒸水洗板 1 次; 用含 0.005 μ L Tween20 的 BSA(10 mg/mL)在 37 $^{\circ}$ C 下封闭 1 h, 然后洗板; 用 BSA 稀释血清成 1:100 浓度, 每个样品 3 复孔, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗板后加入 1:5000 稀释的羊抗大鼠 IgG 抗体(50 μ L/孔), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板; 最后在每孔加入 100 μ L 酶标底物. 显色充分后加入 1 mol/L H₂SO₄ 50 μ L 中止, 用酶标仪在 490 nm 处测定 A 值^[12].

(vi) 外周血白细胞总数和脾脏指数测定. 外周血用肝素抗凝, 应用 JXJ-6 白细胞分类计数器显微镜下计数. 脾脏重量以脾脏指数(脾(mg)与体重(g)之比)表示.

(vii) 统计分析. 数据采用 ANOVA 及 post hoc 的 LSD 分析, 以 $P < 0.05$ 为水平显著.

2 结果

2.1 情绪应激对行为的影响

如表 1 所示, 应激期间, EB 组动物表现出明显的攻击行为, 而 NB 和 C 组动物则没有攻击行为的表现, 这一结果表明空瓶刺激诱发出明显的情绪性行为反应.

EB 组和 NB 组在探究行为上无显著差异, 但都明显高于对照组(EB vs C 或 NB vs C, $P < 0.001$). 这一结果提示 NB 组动物在行为上也表现出一定程度的应激. 至于对照组动物, 主要表现出明显的修饰行为, 与 EB 组和 NB 组动物相比差异显著(NB vs C, $P < 0.001$; EB vs C, $P < 0.0001$), 偶有探究行为.

2.2 情绪应激对免疫反应的影响

不同组免疫参数的变化见表 2. NB 和 EB 组的白细胞计数明显低于 C 组(NB vs C, $P < 0.05$; EB vs C, $P < 0.05$). 与对照组 C 相比, NB 组降低了 28%, EB 组下降了 23%.

EB 组的脾脏指数显著低于 NB 组和 C 组(EB vs NB, $P < 0.05$; EB vs C, $P < 0.01$). 但 NB 组与 C 组无差异.

不同组血清中的抗 OVA 抗体的 A 值见表 2. 与 NB 组相比, EB 组大鼠抗 OVA 抗体产生水平明显降低($P < 0.05$), 仅为 NB 组的 75%.

2.3 情绪应激对血中肾上腺素、去甲肾上腺素和皮质酮水平的影响

如表 3 所示, EB 组大鼠的肾上腺素(E)水平显著高于 C 组($P < 0.01$), 而 NB 组的肾上腺素水平与 C 组间则没有差异. EB 组的去甲肾上腺素(NE)水平显著高于 NB 和 C 组(EB vs NB 或 EB vs C, $P < 0.05$), 而 NB 和 C 组间无差别. 至于皮质酮水平, EB 组和 NB 组动物都显著高于 C 组动物(EB vs C, $P < 0.01$; NB vs C, $P < 0.05$).

表 1 情绪应激对大鼠行为反应的影响^{a)}

组别	攻击行为	探究行为	修饰行为
C	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.042	3.0 \pm 0.10
NB	0.0 \pm 0.0	2.7 \pm 0.48**	0.4 \pm 0.052**
EB	2.8 \pm 0.42**	2.6 \pm 0.52**	0.2 \pm 0.042**

a) C 为控制组, NB 为不给予空瓶组, EB 为空瓶组. 行为指标分以 $M \pm SD$ 表示; ** 示 $P < 0.001$ (EB 组的攻击行为与 C 和 NB 组比较, EB 和 NB 组探究行为和修饰行为与 C 组比较)

表2 情绪应激对抗 OVA 抗体产生、血白细胞数目和脾脏指数的影响($M \pm SD$)^{a)}

组别	抗 OVA 抗体 ($A_{490\text{ nm}}$)	血白细胞数目/ 细胞数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$	脾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
C	1.11 \pm 0.21	8700 \pm 4463	1.97 \pm 0.23
NB	1.21 \pm 0.18	6226 \pm 2380*	1.82 \pm 0.23
EB	0.91 \pm 0.21*	6688 \pm 2082*	1.62 \pm 0.17**

a) * 示 $P < 0.05$ (EB 组抗 OVA 抗体与 NB 组比较, EB 和 NB 组血白细胞数目与 C 组比较); ** 示 $P < 0.01$ (EB 组脾脏指数与 C 组比较)

表3 应激对大鼠血浆肾上腺素、去甲肾上腺素和皮质酮水平的影响($M \pm SD$)^{a)}

组别	肾上腺素/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	去甲肾上腺素/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	皮质酮/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
C	3.84 \pm 1.28	1.11 \pm 0.43	28.77 \pm 23.60
NB	4.38 \pm 1.55	1.14 \pm 0.52	62.30 \pm 28.10*
EB	5.59 \pm 1.85**	1.71 \pm 0.64*	79.93 \pm 20.87**

a) * 示 $P < 0.05$, ** 示 $P < 0.01$ (EB 组肾上腺素水平与 C 组比较, EB 组去甲肾上腺素水平与 C 组和 NB 组比较, EB 和 NB 组皮质酮水平与 C 组比较)

3 讨论

本文旨在介绍一种新的情绪应激模式,即以不确定性空瓶饮水刺激作为应激源,观察其对大鼠行为、神经内分泌和免疫功能的影响。以前的研究^[13,14]及本实验结果表明,情绪应激不仅激活了 HPA 和 SNS 轴(肾上腺素、去甲肾上腺素和皮质酮水平升高),抑制了免疫功能(脾脏指数降低,特异性抗 OVA 水平降低),而且产生了明显的攻击性行为。庞炜等人^[15]的研究还证实采用这种方式造模的情绪应激甚至影响到子代的学习能力。

虽然反复实验的结果证明了这一情绪应激模式的稳定性和可应用性,然而有些问题尚需进一步论证和讨论。

首先是关于空瓶饮水刺激与单纯缺水应激对机体影响的问题。NB 组,即在固定饮水时间点不给水也不给予空瓶刺激的动物,其探究行为和皮质酮水平显著高于对照组动物,提示单纯缺水也使这些动物受到一定程度的应激。但是,单纯缺水的动物的应激不同于空瓶刺激的应激,它并不影响抗体水平和脾脏指数,也不激活交感神经系统。

通过对 EB 组和 NB 组动物在行为、神经内分泌和免疫参数上的比较,可以分离出单纯心理因素的作用。两组对比表明,交感神经系统,也即肾上腺素和去甲肾上腺素的变化只与心理操纵有关,即在受到空瓶刺激时才能激活。单纯缺水而无空瓶刺激并不能激活交感神经系统的兴奋。

两组对比还提示,EB 组和 NB 组的血白细胞数目

的降低与下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴分泌的肾上腺皮质酮升高有关,而 EB 组的体液免疫功能的抑制与儿茶酚胺,特别是去甲肾上腺素水平的升高有关。另外的相关性分析也发现,抗 OVA 抗体的生成与去甲肾上腺素含量呈负相关而与皮质酮水平则不存在这种关系^[13]。

大量的研究已证实,应激能够激活交感神经系统和 HPA 轴,导致从交感神经末梢和肾上腺髓质释放儿茶酚胺以及从肾上腺皮质释放糖皮质激素。儿茶酚胺和糖皮质激素都被证明可以影响免疫功能^[16,17]。我们的结果提示,儿茶酚胺和皮质酮可能对体液免疫和细胞介导的免疫反应起着不同的作用。交感神经系统可能更多参与情绪应激的体液免疫反应的调节。免疫器官中有交感神经支配以及不同免疫细胞,如 T 细胞和 B 细胞上肾上腺素能受体的存在,为交感神经系统与免疫系统间的作用提供了结构基础^[18]。但交感神经系统如何参与情绪应激引起的体液免疫抑制作用尚需进一步研究。而关于情绪应激和生理性缺水应激对细胞免疫功能的影响,在本工作初步研究的基础上,还需观察更多的细胞免疫指标,如淋转反应和 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 的比率等。

尚需指出的是,尽管 14 d 的空瓶刺激能显著降低特异性抗 OVA 抗体的产生,但较短天数(3 d)的空瓶刺激虽然影响但不能显著影响特异性抗体的产生^[13]。这似乎表明情绪应激对免疫功能的影响有一种慢性的累加效应。

另需提到的是,EB 组和 NB 组的抗体产生虽有显著差异,而 NB 组和 C 组间则没有显著差异,这可能

是因为强烈的应激能抑制抗体反应而轻度的应激可能在某种程度上起着增强抗体产生的作用, 因而 EB 组和 NB 组抗体水平的差值大于 EB 组和 C 组间抗体水平的差值。

关于本应激模式的特异性, 目前国际上报道的动物情绪应激模型, 大多研究动物在特定条件下引起的恐惧情绪。例如大鼠接触猫产生恐惧情绪的应激模式^[19]以及 Croiset 等人^[20]采用的大鼠一次电击后产生被动回避行为的情绪应激模型。但对于人类, 除了恐惧外, 情绪还有多种形式, 如愤怒、焦虑、悲伤和羞耻等^[21]。本研究中, 动物经历的情绪似乎与愤怒或焦虑关系更为密切。

总之, 本工作报道了 EB 和 NB 两种不同的应激源对行为、神经内分泌和免疫反应有着不同的影响, 能够为不同程度和不同类型的应激导致的情绪反应和心境异常建模, 可用于模拟特异性的人类应激情绪如愤怒或焦虑。

致谢 本工作为中国科学院知识创新工程(KSCX2-2-03)和国家自然科学基金(批准号: 39830130)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Brannon L, Feist J. Understanding stress and illness. In: Brannon L, Feist J, 3rd ed. Health Psychology. Company: Brooks/Cole publication, 1997. 72~101
- 2 Spiegel D, Sephton S E. Psychoneuroimmune and endocrine pathways in cancer: Effects of stress and support. *Semin Clin Neeropsychiatry*, 2001, 6: 252~256
- 3 Cohen S, Williamson G M. Stress and infectious disease in humans. *Psychol Bull*. 1991, 109: 5~24
- 4 Weiner H. Social and psychological factors in autoimmune disease. In: Ader R, Fellen D C, Cohen N, 2nd ed. Psychoneuroimmunology. New York: Academic, 1991. 955~1011
- 5 Demetrikopoulos M K, Keller S E, Schleifer J. Stress effects on immune function in rodents. In: Schedlowski M, Tewes U, eds. Psychoneuroimmunology. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. 259~275
- 6 Tewes U. Concept in psychology. In: Schedlowski M, Tewes U, eds. Psychoneuroimmunology. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. 93~111
- 7 Yin D, Tuthill D, Mufson R A, et al. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J Exp Med*, 2000, 191: 1423~1428
- 8 Wu W, Yamaura T, Murakami K, et al. I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci*, 2000, 66: 1827~1838
- 9 Lysle D T, Cunnick J E, Fowler H, et al. Pavlovian conditioning of shock-induced suppression of lymphocyte reactivity: Acquisition, Extinction, and preexposure effects. *Life Sci*, 1998, 42: 2185~2194
- 10 Sainio E L, Lehtola T, Roininen P. Radioimmunoassay of total and free corticosterone in rat plasma measurement of the effect of different doses of corticosterone. *Steroids*, 1998, 51: 609~622
- 11 Gerlo E, Malfait R. High-performance liquid chromatographic assay of free norepinephrine, epinephrine, dopamine, vanillylmandelic acid and homovanillic acid. *J Chromatogr*, 1985, 343: 9~20
- 12 Lin W, King M G, Husband A J. Conditioned behavioral learning activates antibody response to ovalbumin: New evidence for the communication between CNS and immunity. In: proceedings of the second Afro-Asian psychological congress. Beijing: Peking University Press, 1993. 788~793
- 13 邵枫, 林文娟. 情绪应激体液免疫调节作用的影响因素研究. *心理学报*, 2001, 33(6): 543~547
- 14 邵枫, 林文娟, 王玮雯. 心理应激的免疫抑制作用及其神经内分泌反应的相关性. *心理学报*, 2001, 33(1): 43~47
- 15 庞炜, 韩太真, 蒋马丽, 等. 应激刺激对子代大鼠空间学习记忆能力的影响. *西安医科大学学报*, 2002, 23(3): 318~320
- 16 Pacak K, Palkovits M, Kopin L J, et al. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: *in vivo* microdialysis studies. *Fron Neuroendocrinol*, 1995, 16: 89~150
- 17 McEwen B S, Biron C A, Brunson W, et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interact. *Brain Research Rev*, 1997, 23: 79~133
- 18 Mills P J, Diusdale J E. The promise of adrenergic receptors studies in psychophysiological research II: Applications, limitations, and progress. *Psychosom Med*, 1993, 55: 448~457
- 19 Blanchard R J, Nikulina J N, Sakal R R, et al. Behavioral and endocrine changes following chronic predatory stress. *Physiol Behav*, 1998, 63:561~569
- 20 Croiset G, Heijnen C J, Veldhuis H D, et al. Modulation of the immune response by emotional stress. *Life Sci*, 1987, 40: 775~782
- 21 Lazarus R S. From psychological stress to the emotions, a history of changing outlooks. *Annu Rev Psychol*, 1993, 44: 1~21

(2003-01-08 收稿, 2003-04-01 收修改稿)