

情绪应激对不同脑区 c-fos 表达的影响*

邵枫^{1,2} 林文娟² 王玮雯² 陈极寰²

(¹ 北京大学心理学系, 北京 100871) (² 中国科学院心理研究所脑-行为中心, 北京 100101)

摘要 利用电击信号和空瓶刺激两种情绪应激体液免疫调节作用动物模型, 以 c-fos 原癌基因为探针, 观察情绪应激后 2 个小时, 大鼠全脑的 c-fos 原癌基因表达情况, 探讨情绪应激对不同脑区 c-fos 表达的影响。结果表明, 电击信号和空瓶刺激两种情绪应激源均能引起某些脑区或核团的 c-fos 蛋白表达明显增加, 包括额皮质、扣带皮质、杏仁内侧核、前连合核、下丘脑背内侧核弥散部、弓状核、孤束核。结果提示, 这些脑区或核团是情绪应激主要激活的中枢部位。

关键词 情绪应激, c-fos 原癌基因, 脑区。

分类号 B845

1 前言

心理应激的免疫调节作用已被许多动物和人类研究所证实^[1~3]。那么它是如何影响免疫功能的? 目前认为, 心理应激源首先作用于中枢神经系统, 激活某些特异性脑区, 然后通过下丘脑和垂体, 主要引起下丘脑-垂体-肾上腺轴和交感神经系统兴奋, 最终通过糖皮质激素、儿茶酚胺类递质以及其他激素和肽类物质作用于免疫系统的免疫细胞, 引起免疫调节作用。其中明确心理应激激活的脑区结构对于了解中枢神经系统和免疫系统相互作用的中枢机制具有重要的意义, 因此成为近年来心理神经免疫学研究的重点问题。

c-fos 原癌基因是即刻早基因的一种, 它通常处于不活动或表达很低的状态, 但在受刺激时能作出短暂而迅速的反应, 可成为神经元兴奋水平的客观指标。许多内外部刺激均可诱导 c-fos 的表达, 但对不同刺激所反应的区域、时程和强度各不相同, 因而是研究某种特定条件下神经功能状态和通路的一种较理想手段^[4]。近年来许多研究利用 c-fos 免疫组化技术来探讨应激作用的脑区。例如 Pezzone 利用 c-fos 技术发现, Lewis 大鼠厌恶性条件反射所激活的脑区有蓝斑核、孤束核、延髓腹外侧、中脑导水管周围灰质背侧等脑干核团以及下丘脑室

旁核、杏仁核、丘脑核团、皮层感觉运动区等前脑核团^[5]。

本研究利用已建立的电击信号和空瓶刺激的情绪应激免疫调节作用的动物模型^[6,7], 观察给予情绪应激后 2 个小时, 大鼠全脑 c-fos 蛋白的表达情况, 旨在探讨情绪应激对不同脑区 c-fos 表达的影响。

2 材料和方法

2.1 实验动物

28 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 250~300 克, 鼠龄 3 个月左右, 购于中国科学院遗传所动物中心。每只大鼠单笼喂养, 控制室温 (20 ± 3) 和照明 (12 小时照明/12 小时黑暗, 每天早 7 时开始照明)。适应期间所有动物自由饮食、水, 饲料由北京市实验动物中心提供。

表 1 实验动物分组

| 模型 1 (电击信号诱发的 情绪应激模型) | 模型 2 (空瓶刺激诱发的 情绪应激模型) |
|--------------------------|--------------------------|
| 电击组 (S) | 情绪应激组 (ES) |
| 电击 + 信号应激组 (S-S) | 对照组 (C) |
| 装置对照组 (A) | 生理应激组 (PS) |
| 正常对照组 (N) | |

2.2 实验程序

2.2.1 动物分组 所有动物被分成 7 组, 4 只/组,

收稿日期: 2002-10-26

* 基金项目: 中科院知识创新工程项目 (Kscx2-2-03); 国家自然科学基金资助项目 (30200080); 教育部科学技术重点项目 (02170)

通讯作者: 林文娟; E-mail: Linwj@psych.ac.cn

分别用于建立两个情绪应激动物模型。详见表 1。模型 1 的动物在一个房间内单笼喂养,而模型 2 的动物又被分别在另外两个房间内喂养,其中 ES 组动物和 C 组动物在一个房间内单笼喂养,而 PS 组动物则在另一房间内单笼喂养。

2.2.2 动物模型建立

(1) 电击信号诱发的的情绪应激模型(模型 1)

经 1 周适应期后,所有动物于第 8 天(0 天)进行免疫。抗原是用卵清蛋白(grade V ovalbumin, OVA; Sigma 公司产品)溶于磷酸缓冲液(PBS, pH = 7.3),再用等量的弗氏完全佐剂(Gibco 公司产品)乳化而成,浓度为 200 μ g/ml,每只大鼠腹腔注射 100mg/0.5ml OVA。免疫后第一天开始给予应激刺激。足底电击给予的频率和强度是:1.0mA,持续时间 3 秒,间隔时间 15 秒,共 33 次,总时间为 10 分钟(刺激电流由 SMI-1 型动物实验仪供给并调节,电击箱为有机玻璃制成,长宽高分别为 30 \times 30 \times 30cm)。S 和 S-S 组动物在免疫后第一、二天内分别被给予同样频率和强度的 10 分钟电击,而 A 组动物则每天仅被置于电击装置中 10 分钟而无电击, N 组动物无任何特殊处置。免疫后第三天, S-S 和 A 组动物分别被放置电击装置内 10 分钟而无电击; S 和 N 组动物无特殊处置。2 个小时后进行心脏灌流。详见表 2。

表 2 模型 1 的实验程序

| 组别 | 天 数 | | | |
|----------|-----|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 电击组 | OVA | S | S | N |
| 电击+信号应激组 | OVA | S | S | A |
| 装置对照组 | OVA | A | A | A |
| 正常对照组 | OVA | N | N | N |

注:0- 抗原免疫当天;N- 没有任何处置;S- 足底电击;A- 动物被置于电击装置内而无电击。

(2) 空瓶刺激诱发的的情绪应激模型(模型 2)

动物经 1 周适应期后,进行定时喂水训练 1 周即仅每天早 9:00~9:10 和晚 21:00~21:10 给予饮水,其余时间不给水。于第 15 天(0 天)给予所有动物 OVA 免疫,方法和剂量同模型 1。免疫当天晚 21:00~21:10 开始给予情绪应激刺激,具体方法为在定时喂水期间给予 ES 组动物空瓶刺激诱发其情绪应激,PS 组动物在 ES 组接受空瓶刺激的同时亦无水喝,但也无空瓶刺激以排除生理缺水的影响,C 组动物则一直定时饮水。免疫后第一、二、三天分别

在晚 21:00~21:10 或早 9:00~9:10 给予此情绪应激,详见表 3。最后一次情绪应激后 2 个小时,进行心脏灌流。

表 3 模型 2 的实验程序

| 组别 | 时间 | 天 数 | | | |
|-------|-------------|-----|----|----|----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 情绪应激组 | 9:00~9:10 | N | N | ES | ES |
| | 21:00~21:10 | ES | ES | N | |
| 生理应激组 | 9:00~9:10 | N | N | PS | PS |
| | 21:00~21:10 | PS | PS | N | |
| 对照组 | 9:00~9:10 | N | N | N | N |
| | 21:00~21:10 | N | N | N | |

注:ES- 空瓶刺激;PS- 单纯缺水;N- 正常定时饮水

2.2.3 心脏灌流 麻醉动物,腹腔注射 10%水合氯醛,3.5ml/kg 体重;立即左心室- 主动脉插管;0.9%生理盐水 100ml 快速冲洗后,4%多聚甲醛(0.1MPBS 配制)400ml 灌流约 90 分钟;取脑,30%蔗糖溶液(0.1MPBS 配制)4 保存;大鼠脑通过冷冻连续冠状切片,片厚 40 μ m,片距 120 μ m(隔三留一),收集于 0.01M PBS 中。

2.2.4 c-fos 免疫组化方法

洗切片(PBS 0.01M);0.3% H_2O_2 / 甲醇孵育 30min;洗片(5min \times 3);0.3% Triton-X-100/PBS 孵育 20min;正常山羊血清封闭,室温 10min;去血清,加入适当稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育 48h;洗片;滴加生物素二抗,孵育 1h;洗片;SP-HRP 孵育 1h;洗片;DAB 显色 10min 左右;PBS 冲洗终止反应;用稀释的络钒明胶裱片;二甲苯透明,再用树脂封片,观察结果。

2.3 结果判定

以每个单位视野(200 μ m)内 fos 阳性神经元的数目来表示数量。具体判断标准:31~40 个为 + + +,21~30 个为 + + +,11~20 个为 + +,2~10 个为 +,2 个以下为 -。每组 4 只动物,取平均值。

3 结果

3.1 电击信号诱发的的情绪应激组动物的 c-fos 表达

与电击组(S)、装置对照组(A)及正常对照组(N)动物相比,电击+信号应激组(S-S)动物在被给予电击信号刺激(电击装置)后 2 个小时,某些脑区或核团 c-fos 表达明显增多,包括额皮质(Fr)及扣带皮质(Cg)、杏仁内侧核前部(MeA)、杏仁中央核内侧部(CeM)、杏仁中介核(I)、杏仁内侧核

(Me)、杏仁外侧核(La)、前连合核(AC)、下丘脑背内侧核弥散部(DMD)、弓状核(Arc)、孤束核(Sol), 详见表 4。

表 4 电击信号应激后 2 小时全脑 c-fos 蛋白的表达

| 组别 | Fr | Cg | MeA | CeM | I | Me | La | AC | DMD | Arc | Sol |
|-----|------|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|
| S-S | ++++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++++ |
| S | ++ | + | + | + | ++ | + | + | - | + | + | + |
| A | ++ | ++ | + | ++ | + | + | + | + | - | + | ++ |
| N | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + |

注:S-S:电击+情绪应激组;S:电击组;A:装置对照组;N:正常对照组。

额皮质(frontal cortex, Fr);扣带皮质(cingulum cortex, Cg);杏仁内侧核前部(anterior part of medial nucleus amygdala, MeA);杏仁中央核内侧部(medial part of central nucleus amygdala, CeM);杏仁中介核(intercolated nuclei amygdala, I);杏仁内侧核(medial nucleus amygdala, Me);杏仁外侧核(lateral nucleus amygdala, La)前连合核(nucleus of anterior commissure, AC);下丘脑背内侧核弥散部(diffuse part of dorsomedial nucleus hypothalamus, DMD);弓状核(arcuate nucleus, Arc);孤束核(solitary nucleus, Sol)。

3.2 空瓶刺激诱发的情绪应激组动物的 c-fos 表达

与生理应激组(PS)、对照组(C)及正常对照组(N)动物相比较,空瓶刺激作为情绪应激源的情绪应激组(ES)动物明显表达 c-fos 的脑区包括伏核(Acb)、下丘脑前区前部(AHA)、前连合核(AC)、下

丘脑外侧前核(LA)、下丘脑外侧区(LH)、下丘脑背内侧核弥散部(DMD)、杏仁内侧核(Me)、弓状核(Arc)、孤束核(Sol)、额皮质及扣带皮质(Fr, Cg)。详见表 5。

表 5 空瓶刺激应激后 2 小时全脑 c-fos 的表达

| 组别 | Fr | Cg | Acb | AHA | LA | Me | LH | AC | DMD | Arc | Sol |
|----|------|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|------|------|
| ES | ++++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++++ |
| PS | + | ++ | + | +++ | +++ | + | + | + | + | + | + |
| C | + | + | + | - | + | + | - | + | - | + | ++ |

注:ES:空瓶刺激的情绪应激组;PS:生理应激组;C:对照组。

额皮质(frontal cortex, Fr);扣带皮质(cingulum cortex, Cg);伏核(nucleus accumbens, Acb);下丘脑前区前部(anterior hypothalamic area, AHA);下丘脑外侧前核(lateroanterior hypothalamic nucleus, LA);杏仁内侧核(medial nucleus amygdala, Me);下丘脑外侧区(lateral hypothalamic area, LH);前连合核(nucleus of anterior commissure, AC);下丘脑背内侧核弥散部(diffuse part of dorsomedial nucleus hypothalamus, DMD);弓状核(arcuate nucleus, Arc);孤束核(solitary nucleus, Sol)。

两种类型情绪应激源激活的共同脑区包括弓状核(Arc)、杏仁内侧核(Me)、下丘脑背内侧核弥散部(DMD)、前连合核(AC)、孤束核(Sol)、丘脑外侧背核(LD)、额皮质及扣带皮质(Fr, Cg)。

4 讨论

根据实验结果,对于两个情绪应激模型而言,情绪应激后两个小时,共同明显表达 c-fos 的脑区包括额皮质及扣带皮质、杏仁内侧核、前连合核、下丘脑背内侧核弥散部、弓状核、孤束核。该结果表明,情绪应激主要激活这些脑区核团。这与其它此方面的研究报道并不完全一致。例如 Bruijnzeel AW 等同样利用 c-fos 探针发现,一次短暂的情绪应激主要激活以下脑区:额叶皮层、粒细胞脑岛皮层、终纹床核、蓝斑、孤束核、杏仁核基底外侧部、海马 CA1

区、下丘脑室周核、中央灰质底外侧等^[8]。此外,以电击装置作为信号刺激的情绪应激组动物明显表达 c-fos 的脑区除上述核团外,主要是杏仁核的表达,进一步证实了杏仁核主要与恐惧情绪相关。而在空瓶刺激作为情绪应激源的动物模型中,情绪应激组与生理应激组动物 c-fos 表达的共同脑区是下丘脑外侧前核和下丘脑前区前部,提示这两个部位可能与生理性缺水相关。下面具体阐述上述脑区核团在情绪应激反应中枢机制中的作用。

4.1 额皮质及扣带皮质

额叶皮质在情绪反应的中枢神经环路中的作用已被研究所证实^[9]。目前认为,情绪应激包括条件反射性恐惧和新异环境刺激属于边缘系统敏感性应激源,它们所诱发的应激反应需要脑高级结构的介入如前额叶、海马;而一些生理性应激源如缺血等则

属于边缘系统不敏感性应激源,它们可通过直接的通路作用于下丘脑等脑区^[10]。人类临床研究亦证明,前额叶损伤能降低情绪反应^[9]。说明额叶皮质不仅参与了认知活动,还可能在情绪应激反应的中枢调节中发挥作用。扣带回与情绪反应间的关系尚不明确,但已有研究表明,急性电击能引起扣带区 c - fos 表达^[11],而且已知扣带回与边缘系统关系密切,故扣带回也可能参与了情绪应激的中枢环路。

4.2 杏仁体

杏仁体与情绪的关系早已被研究所证实。以往的研究多认为,杏仁中央核参与了恐惧情绪的生理、行为及内分泌反应,如我国学者常青发现,杏仁中央核损毁能逆转条件反射性恐惧应激引起的细胞免疫功能下降*。Van de Kar 等的研究证实,电损伤杏仁中央核能阻止由条件反射性恐惧应激引起的皮质酮的释放^[12]。而近年来澳大利亚的 Day T A 等研究认为,杏仁中央核参与物理应激源的信息传递,而杏仁内侧核则参与了情绪应激源的信息传递^[13]。

4.3 下丘脑核团

已知弓状核既有传出纤维投射至孤束核,又有来自杏仁核的传入纤维,另外研究已证实,弓状核在神经内分泌调节中发挥主要作用,弓状核的神经传入能影响室旁核调节的激素的释放。因此说弓状核可能是杏仁核与孤束核间联系的中继站。我们的实验发现,情绪应激能显著激活下丘脑背内测核的 c - fos 表达,这与 Pezzone MA 的实验结果相一致。他们的研究证实,条件反射性应激刺激能诱发背内侧核的 c - fos 表达明显增加^[14]。已知 DM 的传出纤维可直接投射至脊髓的植物神经节前神经元,从而调节交感神经的活性。

4.4 孤束核

孤束核是脑干的自主神经中枢。以往的研究认为,孤束核主要参与味觉、心血管、呼吸、胃肠道活动等反射弧。但我们的实验发现,情绪应激组大鼠孤束核有明显的 c - fos 表达,其余几组动物则没有。这一结果提示,孤束核一方面与吞咽动作、摄水行为、胃肠道反应相关,另一方面还与应激反应相关,这与其它研究结果相一致^[11]。许多实验已证实,各种类型应激源均能激活孤束核的 c - fos 的表达,提示孤束核在应激引起的生理行为及免疫变化方面发挥着重要作用。

另外根据神经解剖学资料,上述脑区核团之间

存在广泛的纤维联系,如额叶 - 孤束核神经通路,额叶、扣带皮质 - 丘脑 - 杏仁体 - 下丘脑 - 孤束核神经通路,额叶、扣带皮质 - 丘脑 - 杏仁体 - 孤束核神经通路等。提示情绪应激源可能首先作用于额皮质和扣带皮质,然后最终引起孤束核的激活。而孤束核通过孤束核脊髓束,与脊髓自主神经中枢相联系,从而可将信息传至自主神经周围部,刺激淋巴器官(胸腺、脾、淋巴结)分布的交感神经末梢,调节免疫系统功能。

本实验以 c - fos 原癌基因为探针,利用电击信号和空瓶刺激的情绪应激免疫调节作用的动物模型,旨在探讨情绪应激对不同脑区 c - fos 表达的影响。研究表明,额皮质、扣带皮质、杏仁体、前连合核、下丘脑背内侧核弥散部、弓状核、孤束核等脑区核团是情绪应激激活的主要中枢部位。而有关这些脑区核团在情绪应激免疫调节中的作用有待于进一步的研究和探讨。

参 考 文 献

- 1 Maes M, Van Bockstaele D R, Gastel A, et al. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. *Neuropsychobiology*, 1999, 39(1): 1 ~ 9
- 2 Strange K S, Kerr L R, Andrews H V, et al. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22(1): 89 ~ 102
- 3 Wu W, Yamaura T, Murakami K, et al. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26 - L5 carcinoma cells by suppressing immune response in mice. *Life Sci*, 2000, 66(19): 1827 ~ 1838
- 4 Lin W J. Review and research ideas on Psychoneuroimmunology. *Acta Psychologica Sinica*, 1997, 29(3): 301 ~ 305 (林文娟. 心理神经免疫学的研究及其思路问题. *心理学报*, 1997, 29(3): 301 ~ 305)
- 5 Pezzone MA, Lee WS, Hoffman GE, et al. Induction of c - fos Immune Reactivity in the Rat Forebrain by Conditioned and Unconditioned Aversive Stimuli. *Brain Res*, 1992, 597: 41
- 6 Shao F, Lin W J, Wang W W, Zheng L. Modulation of the primary humoral immunity by emotional stress. *Acta Psychologica Sinica*, 2000, 32(4): 428 ~ 432 (邵枫, 林文娟, 王玮雯, 郑丽. 电击信号应激对大鼠体液免疫及内分泌功能的影响. *心理学报*, 2000, 32(4): 428 ~ 432)
- 7 Shao F, Lin W J, Wang W W. The effect of emotional stress on the primary humoral immunity of rats: interaction with the sympathetic nervous system. *Acta Psychologica Sinica*, 2001, 33(1): 43 ~ 47

*常青. 杏仁中央核在应激导致的大鼠细胞免疫内分泌改变中的中介作用研究. 北京大学博士学位论文, 心理学系, 1998。

- (邵枫,林文娟,王玮雯. 心理应激的免疫抑制作用及其与神经内分泌反应的相关性研究. 心理学报, 2001, 33(1): 43 ~ 47)
- 8 Bruijnzeel A W, Stam R, Compaan JC et al. Long - term sensitization of fos - responsibility in the rat central nervous system after a single stressful experience. *Brain Res*, 1999, 819: 15 ~ 22
 - 9 Fellous J M. Neuromodulatory Basis of Emotion. *The Neuroscientist*, 1999, 5(5): 283 ~ 294
 - 10 Herman J P, Cullinan W E. Neurocircuitry of Stress: Central Control of the Hypothalamo - Pituitary - Adrenocortical Axis. *Trends Neurosci*, 1997, 20: 78 ~ 84
 - 11 Herrera D G, Robertson H A. Activation of c - fos in the Brain. *Prog in Neurobiol*, 1996, 50: 83 ~ 107
 - 12 Van de Kar L D, Piechowski R A, Rittenhouse P A, et al. Amygdaloid Lesions: Differential Effect on Conditioned Stress and Immobilization - Induced Increases in Corticosterone and Renin Secretion. *Neuroendocrinology*, 1991, 54: 89 ~ 95
 - 13 Day T A, Buller K M, Xu Y, et al. Separation of Neural Pathways Mediating HPA Axis Response to Emotional and Physical Stressors. III Congress of Neurology, 1999
 - 14 Pezzone M A, Lee W S, Hoffman G E, et al. Activation of Brainstem Catecholaminergic Nervous by Conditioned and Unconditioned Aversive Stimuli as Revealed by c - fos Immunoreactivity. *Brain Research*, 1993, 608: 310

THE EFFCET OF EMOTIONAL STRESS ON THE C - FOS GENE EXPRESSION OF BRAIN AREAS

Shao Feng^{1,2}, Lin Wenjuan², Wang Weiwen², Chen Jihuan²

(¹ Department of Psychology, Peking University, Beijing, 100871 China)

(² Brain - Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101 China)

Abstract

To explore the effect of emotional stress on c - fos gene expression of brain areas, two types of animal models of immunomodulation induced by emotional stressor were used. One was footshock apparatus as signal stimuli to cause the rats which were given footshock before emotional stress, the other was empty water bottle to cause the rats which were trained to drink water at two set times each day emotional stress. Both of the emotional stressors were demonstrated to suppress the primary immunity of rats. The c - fos gene, a nuclear proto - oncogene, is transiently expressed in neurons after stimulation and within one hour produces detectable amounts of its product, c - fos. Immunocytochemical localization of the c - fos protein was used to determine neuronal activation in areas of the central nervous system. After two hours of emotional stress, the rats were perfused transcardially, then the brains were removed, blocked, immersed, cut with a freezing microtome, immunocytochemical stained. The results showed that compared to rats in control groups, c - fos protein was strongly expressed at several brain areas in rats of the emotional stressed group. The brain areas contain frontal cortex, cingulum cortex, amygdala, anterior commissure nucleus, arcuate nucleus, diffuse part of dorsalmedial nucleus hypothalamus, solitary nucleus. Conclusion: These brain areas maybe the major central areas activated by the emotional stress.

Key words emotional stress, c - fos gene, brain areas.