

不同时期应激对大鼠行为、 免疫和交感神经系统反应的影响*

王玮文^{1,2} 邵枫³ 林文娟^{1,2}

(¹中国科学院心理研究所心理健康重点实验室,北京 100101)

(²中国科学院心理研究所脑-行为研究中心,北京 100101) (³北京大学心理学系,北京 100871)

摘要 研究不同时期情绪应激诱导的大鼠行为、免疫和神经内分泌反应的动态变化及其相互关系。实验采用一种在程序性饮水的固定时间点不确定性给予大鼠空瓶刺激诱发其情绪反应的应激模式,测定不同时期(14, 21和28天)应激对大鼠行为、交感神经系统反应、体液免疫功能及体重增长的影响。结果表明,情绪应激导致大鼠攻击行为显著增加,且在整个应激过程中情绪应激组大鼠的攻击行为都被稳定地诱导;不同时期的情绪应激均导致大鼠特异性抗 OVA 抗体水平明显降低,且降低的程度类似;在情绪应激的第 14天和 28天应激组大鼠血中去甲肾上腺素水平明显高于对照组,但后者升高的水平明显低于前者。此外,14天应激明显抑制大鼠的体重增长,但随着应激时程的延长,体重增长逐渐恢复。这些结果表明,随着应激时程的延长,大鼠行为、免疫和神经内分泌反应的适应性改变存在时程差异,有助于进一步了解应激诱发的各种反应间的复杂关系。

关键词 情绪应激,体液免疫,去甲肾上腺素,行为。

分类号 B845

1 前言

实验和临床研究都证实,应激刺激能够诱导个体行为、免疫和神经内分泌的广泛反应,并与多种心身疾病的发生和恶化密切相关。首先,应激刺激诱发多种行为的改变,如焦虑、抑郁、探究、攻击行为以及睡眠节律和活动量的改变等^[1,2]。其次,应激刺激可激活神经内分泌系统,例如下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)和交感神经系统(Sympathetic nervous system, SNS),导致糖皮质激素和儿茶酚胺(包括肾上腺素和去甲肾上腺素)水平显著升高。第三,在糖皮质激素和儿茶酚胺等的作用下,应激刺激诱导多种免疫改变,包括:淋巴细胞增殖反应降低、NK细胞活性下降、抗体生成水平降低、以及多种细胞因子产生减少等^[3-5]。

但是目前,有关应激对行为、神经内分泌和免疫反应的影响及其相互关系的研究得到的结果并不完全一致,甚至相互矛盾^[6,7]。一般认为,研究采用的应激类型、应激时程以及动物种系、性别等的不同是

导致结果不一致的原因。除此而外,造成差异的一个可能的原因是:在慢性应激情况下,上述应激反应可能产生适应性的改变,而不同应激反应适应性变化过程可能存在时程差异。采用本实验室建立的在程序性饮水的固定时间点不确定性给予大鼠空瓶刺激诱发其情绪反应的应激模型,我们以前的研究发现,14天情绪应激能显著降低大鼠抗卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)的抗体水平,而3天情绪应激则未能引起免疫功能的明显改变^[14]。利用相同的应激模式,一系列的研究结果表明,14天的情绪应激不但抑制大鼠的体液免疫功能,同时诱发大鼠明显的攻击行为,升高皮质酮和去甲肾上腺素的水平。相关性分析进一步发现,抗OVA抗体水平与去甲肾上腺素含量呈负相关关系而与皮质酮水平则不存在这种关系^[8]。这些结果提示,应激诱发的行为、免疫和神经内分泌反应与应激的时程有关。然而,在更长时程的应激条件下,这些应激反应的适应性变化特点及其相互关系目前还不清楚。本研究在已有的工作基础上进一步探讨不同时期情绪应激对大鼠行为、免疫、交感神经系统和躯体(体重)反应的动

收稿日期:2006-06-12

*国家自然科学基金项目资助(30500158; 30670707),中国科学院创新工程(KSCX2-2-03)项目。

通讯作者:林文娟, E-mail: liwj@psych.ac.cn

态影响及其相互关系,这有助于进一步理解和阐明各种应激反应间的复杂关系。

2 实验材料和方法

2.1 实验动物

本研究选用纯品系雄性 Wistar 大鼠,体重 250~300g(月龄 2.5~3个月)。动物购自卫生部生物制品检定所实验动物研究中心。动物到达实验室后,单笼喂养,适应一周,在适应期间动物自由摄食、饮水。室温控制在 21~23℃,采用 12h 昼/12h 明暗控制(7:00~19:00 照明)。

2.2 实验程序

将动物随机分成 4 组:情绪应激组(ES)($n=19$)、生理应激组(PS)($n=19$)、定时饮水组(C1)($n=15$)和自由饮水组(C2)($n=15$)。C2 组动物在整个实验期间自由饮水。其余三组经 1 周适应期后,进行定时喂水训练一周。定时喂水训练为每日 2 次,即每天早 9:00~9:10 和晚 21:00~21:10 饮水,其余时间不给水。随后进入 4 周的情绪应激期。应激首日定时饮水后所有动物腹腔注射 100 μ g 抗原卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)(OVA 溶于 PBS 加入等体积的弗氏完全佐剂乳化而成)。同日晚开始给予情绪应激刺激。具体方法为在定时喂水期间随机给予 ES 组动物空瓶刺激诱发其情绪应激,一天至少给与一次情绪应激;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;C1 组动物一直定时饮水;为避免相互干扰,C2 组和 PS 组分别置于不同的房间,ES 组和 C1 组置于同室。前 14 天刺激与以前采用的程序一致^[9],后两周重复一遍。

2.3 行为测试

通过录像每两天观测一次 ES 组、PS 组和 C1 组动物的行为。根据以前的研究,测定的行为指标包括:攻击(咬或推撞空瓶和笼子),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)^[10]。通过录像分析动物行为的具体方法是将应激的 10min 等分为 10 个时间段,在每个时间段内记录每只动物上述三种行为,行为出现即为 1,否则为 0。10min 内 10 次观察的总分为 0~10 之间。

2.4 血清抗体水平测定

采用切尾取血方法,在应激 14、21 和 28 天分别鼠尾取血,分离血清。血清抗 OVA 抗体水平用 ELISA 法测定。用 OVA(100 μ l/孔,1mg/ml)包被 96

孔酶标板,4 过夜。用含吐温 20 的磷酸缓冲液(0.05% Tween20, PH7.3)洗板两次,双蒸水洗板一次;用含 0.005 μ l 吐温 20 的 BSA(10mg/ml)在 37℃ 下封闭 1 小时,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℃ 孵育 1 小时;洗板后加入过氧化物酶标记的羊抗大鼠 IgG 抗体(1:5000 稀释,50 μ l/孔),37℃ 孵育 1 小时,洗板;最后在每孔加入 100 μ l 酶标底物。显色充分后加入 50 μ l 12N H₂SO₄ 中止,用酶标仪在 490nm 处测定吸光度 OD 值。

2.5 血浆去甲肾上腺素水平测定

在第 14 天和第 28 天应激结束后立即每组各取 5 只动物断头取血,分离血浆。采用高效液相色谱-电化学检测法(HPLC-ED)测定血浆 NE 水平^[11]。

2.6 日均饮水量和体重测定

每 4 天测定一次各组动物的日均饮水量,每周测定一次大鼠的体重。为了避免饮水和进食的影响,体重测定在给水前进行。

2.7 统计分析

数据以均值±标准误表示。采用 SPSS 统计软件进行数据分析,单因素方差分析法(one-way analysis of variance, ANOVA)比较组间差异, $p < 0.05$ 为差异显著;进一步 post-hoc 分析两组间差异采用 LSD, $p < 0.05$ 为差异显著。

3 实验结果

3.1 不同时程应激对大鼠行为的影响

4 周情绪应激及在应激不同时间(第一周,第三周和第四周),各组大鼠攻击行为、探究行为和修饰行为的观测结果如图 1 所示。在整个 4 周应激期间,ES 组动物表现出明显的攻击行为,而 C1、PS 组动物则没有或仅偶尔表现攻击行为。PS 组的探究行为表现最明显,PS 组和 ES 组动物的探究行为都明显高于定时饮水组(ANOVA: $F(2, 50) = 88.672$, $p < 0.01$; post hoc: ES vs C1, $p < 0.05$, PS vs C1, $p < 0.01$)。C1 组动物表现出明显的修饰行为,与 ES 组和 PS 组相比差异显著((ANOVA: $F(2, 50) = 164.7$, $p < 0.01$; Post hoc: ES vs C1, $p < 0.01$; PS vs C1, $p < 0.01$) (图 1A)。

应激第一周、第三周和第四周各组动物的行为观测结果表明,应激不同阶段各组大鼠的行为表达特点都是比较一致和稳定的。在每一个观测点 ES 组动物的攻击行为都明显高于 C1 组和 PS 组,而 C1

组和 PS组间没有差别(图 1B); PS组以探究行为最为明显,在每个测定点探究行为的均值大小依次为 PS组 > ES组 > C1组, PS组动物的探究行为均明显

高于 C1组(图 1C); C1组动物的修饰行为在每个行为观测时间点均明显高于 PS组和 ES组(图 1D)。

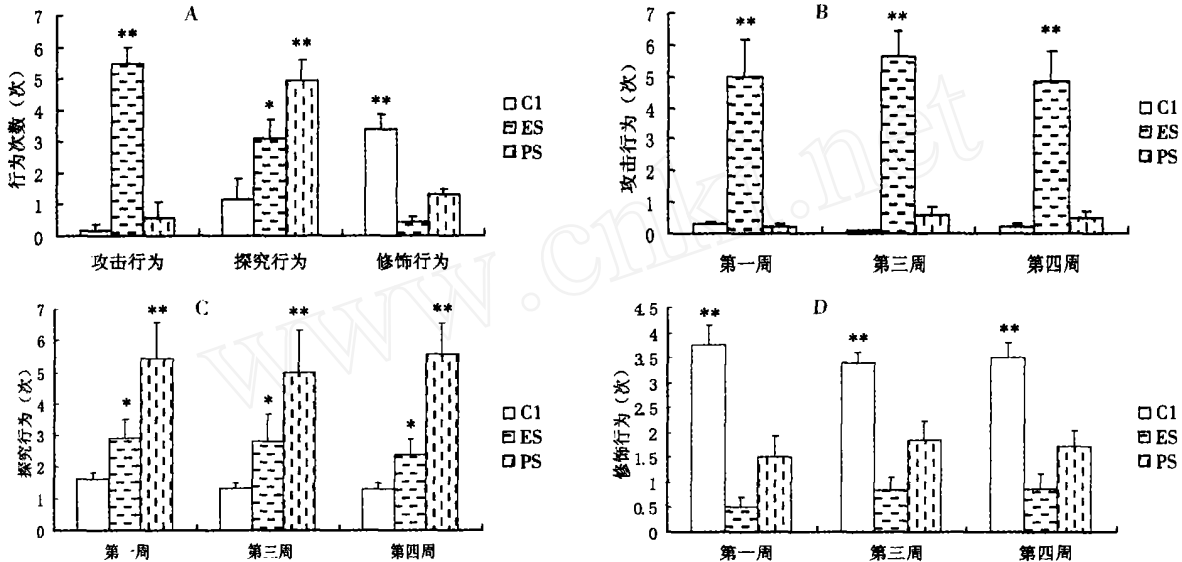


图 1 情绪应激对大鼠行为 ($M \pm SE$)的影响

注: C1:定时饮水组 ES:情绪应激组 PS:生理应激组。*: $p < 0.05$, ES组探究行为与定时饮水组比较; ** : $p < 0.01$, ES组攻击行为与 PS和 C1组比较, PS组探究行为与 C1组比较, C1组修饰行为与 ES和 PS组比较; A: 4周情绪应激期间 C1、ES和 PS组大鼠攻击行为、探究行为和修饰行为; B: 应激第一周、第三周和第四周 C1、ES和 PS组大鼠攻击行为; C: 应激第一周、第三周和第四周 C1、ES和 PS组大鼠探究行为; D: 应激第一周、第三周和第四周 C1、ES和 PS组大鼠修饰行为

3.2 不同时期应激对抗 OVA 抗体水平的影响

血清抗体水平的比较采用重复测定统计方法。组内因素为取血的时间点(第 14, 21 和 28 天 3 个时间点), 组间因素为不同处置的实验组。Post hoc 采用 LSD 进行多重比较。 $p < 0.05$ 为差异显著。结果如图 2 所示, 重复测定分析表明, 无论对于 14 天, 21 天还是 28 天应激, 血清抗体水平均存在显著的组间差异 ($F(3, 56) = 2.01, p = 0.034$; $F(3, 56) = 2.12, p = 0.031$; $F(3, 56) = 2.29, p = 0.027$)。Post hoc 分析表明, ES 组大鼠的抗体水平显著低于 C1 组、C2 组和 PS 组, 其余三组间没有显著差异。与相同饮水程序和日均饮水量类似的 PS 组相比, ES 组在应激第 14 天、21 天和 28 天的平均抗体水平间分别是 PS 组的 82%, 83% 和 76%, 并没有明显差异, 表明延长情绪应激时期并不能使抗体反应产生适应性改变, 也不能进一步增强对 ES 组大鼠抗体水平的抑制作用。

3.3 不同时期应激对血浆 NE 水平的影响

大鼠经历 14 天和 28 天应激后, 血中去甲肾上腺素水平变化如图 3 所示, ANOVA 统计分析表明, 第 14 天和第 28 天应激后 NE 水平在各组间存在显

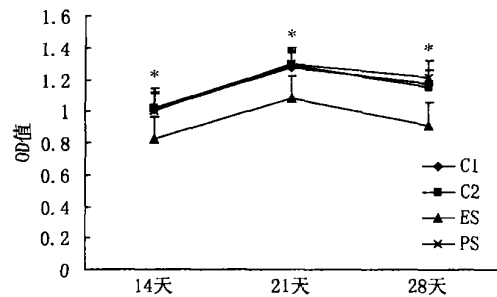


图 2 不同时期应激对血清抗 OVA 抗体水平 ($M \pm SE$)的影响

注: C1:定时饮水组 C2:自由饮水组 ES:情绪应激组 PS:生理应激组; *: $p < 0.05$, ES 组与 C1、C2 和 PS 组相比较

著差异(14 天: $F(3, 16) = 5.67, p < 0.01$; 28 天 $F(3, 16) = 2.24, p < 0.05$)。进一步 post hoc 分析表明, ES 组 NE 水平明显高于 C1、C2 和 PS 组, 其余三组间无明显差异。ES 组在应激 14 天和 28 天的 NE 含量 t 检验有明显差异 ($p < 0.05$)。这些结果提示, 慢性情绪应激能够激活 SNS, 使血中 NE 水平明显升高, 但随着应激时期的延长, SNS 反应出现一定程度的适应性。

3.4 不同时期应激对大鼠体重增长的影响

实验期间各组动物的体重增长情况(以增加的

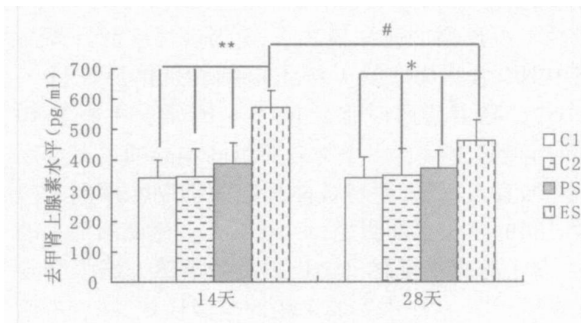


图3 14天和28天应激血浆去甲肾上腺素水平 ($M \pm SE$)

注: C1: 定时饮水组, C2: 自由饮水组, ES: 情绪应激组, PS: 生理应激组。* *: $p < 0.01$, ES组与其余各组比较; * : $p < 0.05$, ES组与其余各组比较; # : $p < 0.05$, ES组14天和28天比较

体重克/周表示)见图4。在7天适应期(1~2)所有动物自由饮食,各组动物的体重均明显增加且平均体重增长没有差异;在一周定时饮水期间(2~3),除C2组外,其余三组动物按照每天两次,每次10min定时饮水,三组大鼠体重仍然保持增长,但与C2组相比,体重增加速率减慢,出现显著差异($F(3, 59) = 7.45, p < 0.008$)。在情绪应激的第一周(3~4),ES组和PS组动物体重明显降低,各组体重增长间差异显著($F(3, 59) = 10.2, p < 0.000$)。post hoc分析表明,C2组和C1组的体重增长速率明显高于其余两组,其余组间没有差异;随着应激时程的延长(4~7),ES组和PS组动物动物的体重又开始缓慢增长,表明动物开始从生理上适应一天一次饮水。在整个应激期间,C1组和C2组保持了比较一致的体重增加趋势;ES组和PS组处于相同程度的缺水条件下,体重增长受到类似的抑制。

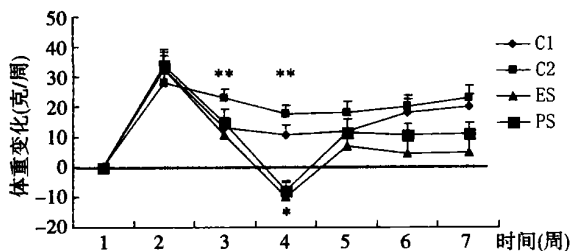


图4 不同程度缺水应激对动物体重增长的影响 ($M \pm SE$)

注: C1: 定时饮水组 C2: 自由饮水组 ES: 情绪应激组 PS: 生理应激组;

* *: $p < 0.01$, C2组与其余各组比较; ES组和PS组与其余两组比较;在饮水量上,C1组的日均饮水量均值约为C2组的60%,而ES组和PS组的日均饮水量均值约为C2组的41%。

4 讨论

4.1 不同时期情绪应激对大鼠行为的影响

以前的研究发现,14天空瓶刺激诱发的情绪应

激能引起情绪应激组动物明显的攻击性行为,而对对照组和生理应激组大鼠仅表现为探究和修饰行为^[9]。本实验进一步观察不同时期(14天、21天和28天)应激对大鼠行为改变的影响。结果表明,不同组动物在整个情绪应激期间都表现出比较一致和稳定的行为特点。ES组动物始终以攻击性行为为主,这种行为表现并没有因应激刺激的反复给予而改变,说明由空瓶刺激所引起的定时饮水动物的情绪应激反应是稳定的。而单纯的缺水仅能引起PS组动物微弱的情绪应激反应,表现为增多的探究行为,定时饮水组动物主要表现为修饰行为。在应激条件下,动物行为是否出现适应性改变受到多种因素的影响,例如慢性社会隔离应激的动物表现出时间依赖性的行为改变,但行为适应性反应的出现和程度受个体应对策略不同的影响^[12]。此外,大量研究表明应激刺激的不可预测确定性是一个重要的影响因素。稳定的应激刺激,如重复多次的旷场应激导致动物出现适应性反应,排泄量明显减少。相反,2~10周的慢性不确定温和应激的动物模型研究表明,慢性应激都能够诱导明显的抑郁行为^[13]。本研究发现不同时期的情绪应激均稳定诱发动物的攻击行为,这可能与空瓶应激刺激以随机或不确定的方式给与有关。因此,该应激模型可以作为诱导攻击行为的稳定的动物模型。但是在这种慢性应激条件下是否会引起动物其它行为,如抑郁等还需要进一步实验证实。

4.2 不同时期情绪应激对大鼠体液免疫功能的影响

采用相同的情绪应激模式,以前的研究证实14天情绪应激抑制大鼠的体液免疫功能,而3次情绪应激则未能引起免疫功能的明显改变^[14],提示应激的体液免疫抑制作用与应激的时期有关。本实验再次证实14天情绪应激可以明显抑制大鼠的体液免疫反应。在此基础上,本研究进一步延长应激时期,但结果表明这并不能进一步增强应激对体液免疫功能的抑制作用,但应激对抗体水平的影响也没有产生适应性减弱。14天、21天和28天的情绪应激均导致情绪应激组的抗OVA抗体水平明显低于自由饮水组、定时饮水组和生理应激组,且抗体降低的程度是类似的。在各个测定时间点,情绪应激组的抗体水平间没有差异。

应激免疫调节作用受应激时期、应激源类型、应激与免疫给予的次序和间隔时间等多种因素的影响。例如,束缚应激1天后,给大鼠腹腔注射绵羊红

细胞 (SRBC) 免疫, 连续 2 天每天 2h 的束缚应激能增强大鼠抗 SRBC 原发性抗体反应, 而更长时间的束缚应激 (连续 4 天每天 6h) 并不能改变抗体反应^[15]。而最近的一项研究采用一种能够诱发抑郁状态的慢性应激模式, 表明慢性应激能够抑制 T 细胞依赖性抗体反应, 而且这种抑制作用是与时程相关的。应激 3 周后开始出现抗体产生减少 ($p < 0.05$)。如继续给予大鼠应激刺激, 在一定时程范围内 (3 ~ 10 周), 这种抑制作用随着应激时间的延长更加明显 ($p < 0.01$)^[16]。在本情绪应激模式下, 情绪应激时间太短 (3 天) 不足以引起明显的体液免疫抑制, 更长时间的应激 (如 14 天) 则可以引起明显的免疫抑制作用, 并且这种抑制性影响比较稳定, 在随后的两周里不发生适应性改变。

4.3 不同时间程情绪应激对 SNS 反应的影响

以前的研究发现, 14 天情绪应激明显抑制大鼠的体液免疫反应和升高血去甲肾上腺素水平, 且二者呈现负相关关系。本研究采用不同时间程的应激刺激也证实了这一点。在两周和 4 周慢性应激都观察到 ES 组大鼠血中 NE 含量明显高于其余各组, 表明慢性应激能激活 SNS。但是不同时间程情绪应激诱导的 NE 水平间也有显著差异, 4 周应激时升高的 NE 水平较两周应激时明显降低, 表明持续的慢性应激后 SNS 反应出现了一定程度的适应性。SNS 反应的适应现象在其它的慢性应激条件下也有报道。比如, 束缚应激明显增加血中 NE 水平, 给予 4 周应激后, NE 水平升高的现象消失^[17]。在导致抑郁的慢性不可预测的应激模式下, Silberman 等 (2004) 也发现前 3 周应激明显升高血浆中 NE 水平。然而当应激继续给予到 4 周至 10 周时, 应激组的 NE 水平与对照组间差异的显著性逐渐降低直至消失^[16]。这些数据表明, 在不同的应激条件下, SNS 适应性反应的出现存在时间差异。对于本实验采用的应激模式, 随着应激时程从 2 周延长到 4 周, SNS 应激反应表现出一定程度的适应。

4.4 SNS 及其它因素在应激体液免疫抑制中的作用

尽管随着应激时程延长外周血去甲肾上腺素水平适应性降低, 但抗体水平并没有相应地升高, 提示可能还有其它因素参与慢性应激的体液免疫调节。

首先, SNS 应激激活后释放的 NE 通过作用于免疫细胞上的去甲肾上腺素能受体调节免疫细胞功能。因此 NE 水平和其受体敏感性的改变都可能影响免疫功能。例如, Silberman 等报道在导致抑郁的

慢性不可预测的应激模式下, 3 周慢性应激升高血浆中 NE 水平及抑制 T 细胞依赖性抗体反应 ($p < 0.05$)。随着应激时程延长 (3 ~ 10 周), 4 周至 10 周时应激组的 NE 水平与对照组间差异的显著性逐渐降低直至消失, 而对抗体反应的抑制作用随着应激时间的延长更加明显 ($p < 0.01$)。免疫细胞上的 α -肾上腺素能受体对 NE 刺激的敏感性增强介导该作用^[16]。对于本实验采用的应激模式, 随着应激时程从 2 周延长到 4 周, SNS 应激反应表现出一定程度的适应, 但免疫细胞上去甲肾上腺素受体的反应性是否发生改变还需进一步的实验证实。

其次, 在本实验模式中, 定时饮水组、生理应激组和情绪应激组都经历不同程度的生理缺水。生理缺水是否会影响体液免疫反应呢? 我们以前的实验研究仅设置了三个实验组, 即定时饮水组、生理应激组和情绪应激组^[9]。各组动物都存在不同程度的缺水, 缺水程度与体液免疫改变间的关系由于没有设置自由饮水组而无法准确地加以分析和比较。因此, 在本实验中增加设置自由饮水组, 考察不同程度的缺水对大鼠体液免疫功能的影响。结果表明, 不同组动物的日均饮水量不同, 相应的各组体重增长也不同, 然而单纯的缺水对抗体反应并没有影响。在整个实验期间, PS 组与 ES 组的日均饮水量和体重都没有显著差异, 但 PS 组的抗体水平显著高于 ES 组, PS 组与 C1 组和 C2 组的抗体水平间也没有显著差异。

其它研究也发现, 动物被剥夺水或食物 48 小时后, 出现皮质酮水平显著增高及其它应激综合征包括淋巴细胞减少, 胸腺、脾脏及淋巴结重量减轻。而当动物同样被剥夺水或食物仅被给予没有任何营养成分而只有欣快作用的安慰剂时则无上述应激综合征的出现, 说明可能是情绪因素决定着由禁食诱发的应激综合征^[18]。此外, 束缚应激的大鼠在应激期间无法饮食, 因此随着束缚应激时间的不同, 动物也受到不同程度的饮食剥夺。研究表明, 束缚应激能够影响大鼠的多项免疫指标, 然而, 相应的饮食剥夺的非应激对照组的免疫指标未受到影响^[15, 17]。可见一定程度的生理缺水并不会影响大鼠的抗体反应, 情绪因素是造成体液免疫抑制的主要原因。

参 考 文 献

- 1 Zelena D, Haller J, Halász J, et al. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. *Brain Research Bulletin*, 1999, 3: 297 ~ 302

- 2 Blanchard R J, McKittrick C R, Blanchard D C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems *Physiology & Behavior*, 2001, 73: 261 ~ 271
- 3 Mcewen B S, Biron C A, Brunson KW, et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions *Brain Research Review*, 1997, 23: 79 ~ 133
- 4 Pruett S B. Stress and the immune system. *Pathophysiology*, 2003, 9: 133 ~ 153
- 5 Padgett D A, Glaser R. How stress influence the immune response. *Trends in Immunology*, 2003, 24 (8): 444 ~ 448
- 6 Araujo A P, DeLucia R, Scavone C, et al. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine - induced locomotion and cyclic AMP - dependent protein kinase activity. *Behavioral Brain Research*, 2003, 139 (1 ~ 2): 75 ~ 81
- 7 Baranyi J, Bakos N, Haller J. Social instability in female rats: the relationship between stress - related and anxiety - like consequences. *Physiology & Behavior*, 2005, 84 (4): 511 ~ 518
- 8 Shao F, Lin W, Wang W, et al. The effect of emotional stress on the primary humoral immunity of rats. *Journal of Psychopharmacology*, 2003, 17 (1): 83 ~ 87
- 9 Shao Feng, Lin Wenjuan, Wang Weiven. The effect of emotional stress on the primary humoral immunity of rats (in Chinese). *Acta Psychologica Sinica*, 2001, 33 (1): 43 ~ 47 (邵枫, 林文娟, 王玮文. 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. *心理学报*, 2001, 33 (1): 43 ~ 47)
- 10 Lin W J, Wang W W, Shao F. New Animal model of emotional stress: behavioral, neuroendocrine and immunological consequences. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48 (15): 1565 ~ 1568
- 11 Gerb E, Malfait R. High - performance liquid chromatographic assay of free norepinephrine, epinephrine, dopamine, vanillylmandelic acid and homovanillic acid. *J. Chromatography*, 1985, 343: 9 ~ 20
- 12 Ruisa M A W, Brakea J H A, Engelc B, et al. Adaptation to social isolation. Acute and long - term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiology & Behavior*, 2001, 73: 541 ~ 551
- 13 Grippo A J, Francis J, Beltz T G, et al. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress - induced anhedonia. *Physiology & Behavior*, 2005, 84: 697 ~ 706
- 14 Shao Feng, Lin Wenjuan. Two kinds of conditions influence the humoral immunomodulation induced by emotional stress (in Chinese). *Acta Psychologica Sinica*, 2001, 33 (6): 543 ~ 547 (邵枫, 林文娟. 情绪应激体液免疫调节作用的影响因素. *心理学报*, 2001, 33 (6): 543 ~ 547)
- 15 Millan S, Gonzalez M I, Giordano M, et al. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. *Life Science*, 1996, 59 (17): 1431 ~ 1442
- 16 Silbeman DM, Ayelli - Edgar V, Zorrilla M. Impaired T - cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2004, 18: 81 ~ 90
- 17 Pitman D L, Ottenweller J E, Natelson B H. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: Chronic stress and habituation. *Physiology & Behavior*, 1988, 43 (1): 47 ~ 55
- 18 Riley V. Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science*, 1981, 212: 1100 ~ 1109

The Dynamic Changes of Behavioral, Immune and Sympathetic Responses to Chronic Stress in Rats

Wang Weiven^{1,2}, Shao Feng³, Lin Wenjuan^{1,2}

⁽¹⁾ Key Lab of Mental Health, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

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

⁽³⁾ Department of Psychology, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract

Previous studies have shown that emotional stress induced by randomly giving an empty water bottle to rats during watering periods for 14 consecutive days activated both the hypothalamic - pituitary - adrenal axis and the sympathetic nervous system, leading to the increased blood levels of corticosterone and norepinephrine. It also elicited attacking and exploring behaviors, suppressed the level of specific anti - ovalbumin IgG antibody production which was negatively related to norepinephrine level. However, three day empty bottle presentation had no significant effect on anti - OVA antibody production. These results suggest that the duration of stressors determines the consequences of body reactions induced by stress, at least, humoral immune responses. In order to examine whether the duration of stress exerts an accumulative effect or an adaptive effect on body reactions, the present study was designed to investigate the dynamic

changes in behavioral, immune and neuroendocrine responses of rats that were subjected to chronic emotional stress with different durations

Male Wistar rats were divided into four groups: (1) emotional stress (induced by randomly giving an empty water bottle to rats at set watering time) ($n = 19$); (2) physiological stress (given neither empty water bottles nor water during the same watering periods as for emotional stress group) ($n = 19$); (3) control 1 (allowed free access to water during watering periods) ($n = 15$); and (4) control 2 (given water ad libitum during the whole experimental periods) ($n = 15$). Behavioral changes, humoral immune responses and the reaction of sympathetic nervous system were measured and compared during different days (14, 21 and 28 days) of stress. The behaviors observed included attacking, exploring and grooming. Norepinephrine levels in plasma were determined using high-performance liquid chromatography. Serum levels of IgG antibodies to Ovalbumin were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

It was found that emotional stress stably induced aggressive behavior of rats over the whole experimental period. Compared with controls, rats subjected to 14, 21 or 28 days of stress showed decrease in the level of specific anti-OVA antibody to a similar degree. Both 14-day and 28-day stress activated the sympathetic nervous system, leading to the increased blood levels of norepinephrine. However, a decline of norepinephrine level was also obvious from 14-day to 28-day stress. The body weight showed an early decrease during the first 14-day stress period but it was gradually recovered after prolonged stress exposure.

Taken together, these results demonstrated different adaptive processes of behavior, immune, neuroendocrine and physical responses to chronic stress, and may be helpful for further understanding the complex relationships among various stress responses.

Key words emotional stress, humoral immunity, norepinephrine, behavior