

早期母婴分离对大鼠成年后再应激及海马神经可塑性的影响

何静 王高华

【摘要】 目的 探讨早年母婴分离对大鼠成年后再应激的行为学和神经可塑性的影响。方法 SD 大鼠分为应激抵抗模型组 [SRM 组, 接受早年早期干预应激+成年慢性温和不可预见刺激(CUMS) 应激]、应激敏感模型组(SSM 组, 接受早年母爱剥夺应激+成年 CUMS 应激)、CUMS 组(仅接受成年 CUMS 应激), 以及正常对照组(NCM 组, 不接受任何应激), 每组 10 只。SRM 组(每天分离时间 15 min)和 SSM 组(每天分离时间 3 h)从出生第 4 天开始和母鼠分开, 持续一周。成年后第 56 天评价旷场实验、强迫游泳的行为学改变。SRM 组、SSM 组和 CUMS 组大鼠成年后接受 CUMS, 持续 4 周后, 再次评价行为学变化, 同时免疫组化比较神经轴突生长和定向分化相关蛋白 GAP-43 表达变化。结果 早年母婴分离时间长的大鼠(SSM 组)与 NCM 组大鼠比较, 旷场总移动距离减少($F=8.466, P=0.001$), 中心移动距离减少($F=4.631, P=0.018$), 强迫游泳不动时间增加($F=5.201, P=0.012$)。母婴分离时间短大鼠(SRM 组)与 NCM 组大鼠相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。成年后再次应激, 与 NCM 组比较, CUMS 组总移动距离减少($P=0.041$), 中心区移动距离减少($P<0.001$); 和 CUMS 组比较, SSM 组旷场总移动距离减少($F=8.868, P<0.001$), 中心移动距离减少($F=13.175, P<0.001$); 免疫组化 GAP-43 表达量 SSM 组低于 NCM 组($P<0.001$)。SRM 组和 NCM 组差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 长时间母婴分离使大鼠成年后对应激敏感, GAP-43 表达减少, 神经可塑性受到抑制。

【关键词】 抑郁; 母婴分离; 神经可塑性; GAP-43; 慢性不可预见温和刺激

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.11.002

Long term effects of early maternal deprivation on adult rats exposed to chronic unpredictable mild stress and hippocampus neuronal plasticity HE Jing, WANG Gao-hua. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 **Objective** To explore the profound influence of early maternal deprivation on mature rats' behavior and neuronal plasticity when exposed to chronic unpredictable mild stress (CUMS) in adulthood. **Methods** Litters were randomly assigned to four groups: SSM (stress sensitive group: a daily 3-hour maternal separation + CUMS), SRM (stress resilient group: a daily 15-min maternal separation + CUMS), CUMS (only CUMS) and NCM (normal control group). On Day 4 of parturition, neonatal pups of SRM and SSM group were separated from their mothers for 1 week. Rats were tested in the open field and their immobility time in forced swimming test on PND56 (the 56th day of post natal). The adult rats of SRM, SSM and CUMS group were exposed to CUMS for 4 weeks. Then the changes of behaviors were reevaluated, at the same time, immunohistochemistry (IHC) were applied to compare the expression of axonal growth and directional differentiation related protein GAP-43 (growth-associated-protein-43). **Results** Compared with NCM group, SSM group showed decreased total distance ($F=8.466, P=0.001$) and central distance ($F=4.631, P=0.018$), and increased forcing swimming time ($F=5.201, P=0.012$). While there was no statistical significance in the difference between SRM group and NCM group ($P>0.05$). In the adulthood stimulation, CUMS group showed decreased total distance ($P=0.041$) and central distance ($P<0.001$) compared to NCM. SSM group showed decreased total distance ($F=8.868, P=0.010$) and central distance ($F=13.175, P<0.001$) compared to the CUMS group. The expression of GAP-43 downregulated for SSM group and CUMS group compared to NCM group after exposed to CUMS ($F=9.756, P<0.001$). Compared SRM group with CUMS group, there was no statistical significance. **Conclusions** Early long time maternal deprivation leads adult rats more vulnerable to stress and downregulate the expression of GAP-43 suppressing neuronal plasticity.

【Key words】 Depression; Maternal deprivation; Neuronal plasticity; Growth-associated-protein-43; Chronic unpredictable mild stress

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81571325)

作者单位: 430060 武汉大学第一临床学院

通讯作者: 王高华 Email: wgh6402@163.com

幼年时的压力比如母婴分离可以影响成年后注意、情感、情绪行为、压力和消化生理,以及自主情绪运动通路的发展。而其中海马是这些变化的显著部位,母婴分离鼠出现海马神经退化、树突萎缩、苔藓纤维减少及齿状回体积减小。海马神经可塑性相关基因存在相关的改变,比如人生长相关蛋白43(GAP-43)、脑源性神经营养因子(BDNF)、突触素表达均减少。GAP-43是生长锥轴突末端的突触前蛋白,在细胞骨架动态性,如轴突生长、定向、突触形成中起着重要作用,是神经可塑性的标记蛋白。GAP-43+/-杂合小鼠表现为对压力的敏感性增加和对海马依赖任务的抵抗^[1]。在神经发育的关键时期,遭受母婴分离,可能激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴,使HPA轴敏感化,导致压力诱导过度反应,增加循环糖皮质激素水平,对大脑结构和功能可能产生深远持久的影响。成年后再次遭受慢性温和不可预见刺激(CUMS),表现出对压力的敏感和过度反应^[2]。

研究表明,出生后2周内遭受持久而连续的(>3 h/d)母婴分离,可对新生幼鼠造成强烈刺激,使其对应激的抵抗性下降,增加成年后再次遭受应激时敏感性,导致成年后抑郁症、焦虑症的发病,称之为应激敏感;遭受相对短暂的(<3 h/d)母婴分离,由于应激时间较短,幼鼠有充足的时间习得应对策略,可增强成年后应激抵抗^[3]。因此本研究主要探讨早年母婴分离对大鼠成年后应激的影响及可能的神经机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康SD孕鼠26只,购自同济医学院实验动物中心。实验期间,室温22~25℃,每日光照12 h。

1.1.2 药物及试剂 免疫组化试剂盒(批号:1705179921)购自迈新技术公司; GAP-43兔一抗(批号: ab75810)购自Abcam公司; 4, 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)和DAB购自碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型制作 新生SD雄性大鼠,适应性喂养至出生后第3天(PND3),出生后第4天进行分组。利用随机数字表分为4组,分别为应激抵抗模型组(SRM组,接受早年早期干预应激+成年CUMS应激)、应激敏感模型组(SSM组,接受早年母爱剥夺应激+成年CUMS应激)、CUMS组(仅接受成年CUMS应激),以及正常对照组(NCM组,早年及成年后均不接受任何应激),每组10只。

每日上午(9:00~12:00)开始接受母婴分离,利用无色透明聚乙烯隔板将幼鼠和母鼠分开,待母婴分离完毕后,再放回去。NCM组及CUMS组不接受

母婴分离,SSM组母婴分离3 h/次,SRM组母婴分离15 min/次,每日1次,持续1周。大鼠PND57开始,除NCM组外,均接受CUMS:禁食24 h,禁水24 h,夹尾1 min,热应激(45度,3 min),潮湿垫料,鼠笼倾斜,冰水(0度,3 min)共7种刺激,将上述7种刺激随机安排到28 d内,每日1种刺激,每种刺激平均出现4次。同种刺激不连续出现,以使动物不能预料刺激的发生。

1.2.2 动物行为评定 在CUMS干预前,即出生后第56天(PND56)进行旷场实验和强迫游泳实验。

(1)旷场实验:旷场大小为100 cm×100 cm×30 cm,将大鼠置于旷场中心内,使用动物行为自动跟踪系统(Ethovision 3.0,荷兰)记录并分析大鼠在旷场内5 min的行为,主要观测指标为总移动距离和中心移动距离。(2)强迫游泳:大鼠放在透明圆柱形的水缸中(直径30 cm,高1 m),水深30 cm,大鼠放在水缸中适应性游泳2 min后开始记录5 min内大鼠不动时间。不动时间的判断是大鼠漂浮在水面上或者仅为了保持头部留在水面的小范围滑动。

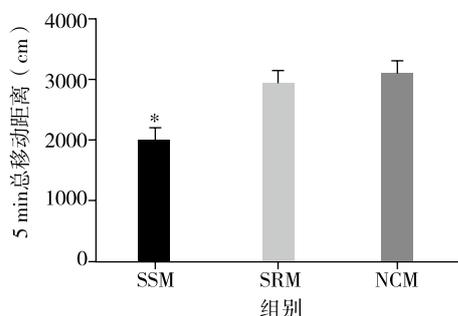
1.2.3 标本采集及免疫组化 大鼠经1%戊巴比妥(40 mg/kg)麻醉后,开胸并暴露出心脏,心脏收缩时从左心室插入灌流针至主动脉固定。先灌注4℃生理盐水100~200 ml,直至流出的液体清亮,再用4%多聚甲醛灌注,先快后慢,直至四肢僵硬。将大鼠断头,取出脑组织,放在4%甲醛溶液中过夜,经过酒精脱水及二甲苯透明后,石蜡包埋。取大鼠海马做连续切片。经过烤片,二甲苯脱蜡及梯度酒精脱水等,微波抗原修复,3%过氧化氢抑制内源性过氧化物酶,免疫组化放大试剂,一抗兔GAP-43(1:750)4℃过夜,PBS代替一抗作阴性对照,DAB(1:150)显色,苏木精复染,中性树胶封片。在Olympus正置显微镜下拍照,曝光时间、光强等条件相同。图片用Image-Pro Plus处理。

1.3 统计学方法 采用SPSS 19.0进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者组间比较用LSD-*t*检验,方差不齐者进行平方根或者对数转换,若方差仍不齐,进行Games-Howell检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

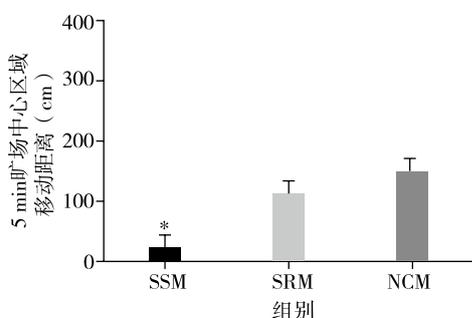
2.1 早年母婴分离对大鼠行为学改变的结果 见图1~3。旷场实验结果显示,3组大鼠旷场总移动距离和中心移动距离的差异均有统计学意义($F=8.466$, $P=0.001$; $F=4.631$, $P=0.018$),且SSM组低于NCM组,差异均有统计学意义($P=0.001$, $P=0.005$),而SRM组与NCM比较,差异无统计学意义($P=0.570$, $P=0.256$)。

强迫游泳实验结果显示, 3组不动时间差异有统计学意义($F=5.201, P=0.012$), SSM组不动时间长于NCM组和SRM组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。



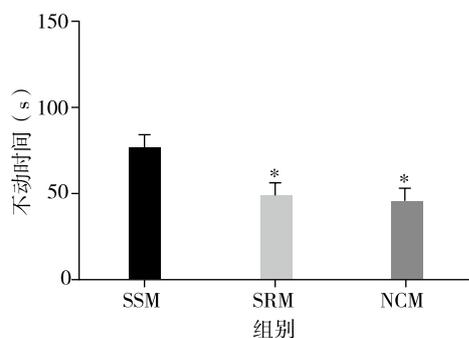
注: 与NCM组比较* $P < 0.01$

图1 PND56各组大鼠5 min旷场总移动距离比较



注: 与NCM组比较* $P < 0.01$

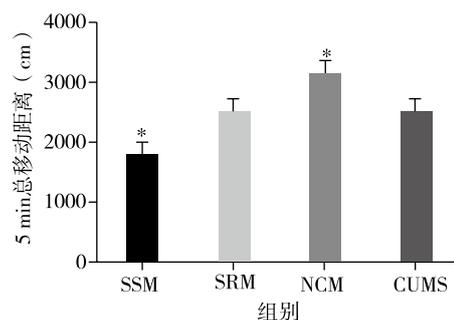
图2 PND56各组大鼠5 min旷场中心区域移动距离比较



注: 与SSM组比较* $P < 0.01$

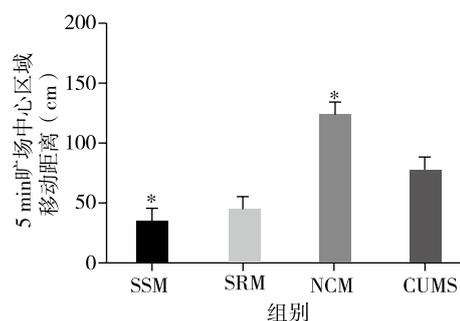
图3 PND56各组大鼠5 min强迫游泳不动时间比较

2.2 早年母婴分离及成年后再次应激大鼠行为学改变的结果 见图4, 5。结果显示, 4组之间旷场移动距离差异有统计学意义($F=8.868, P < 0.001$)。CUMS组与NCM组比较, 总移动距离减少($P=0.041$), 中心区移动距离减少($P < 0.001$); SRM组和CUMS组比较, 总移动距离差异无统计学意义($P=0.972$); SSM组和CUMS组相比总移动距离减少($P=0.01$), 中心区移动距离减少($P < 0.01$)。



注: 与CUMS组比较* $P < 0.01$

图4 PND90各组大鼠5 min旷场总移动距离比较



注: 与CUMS组比较* $P < 0.01$

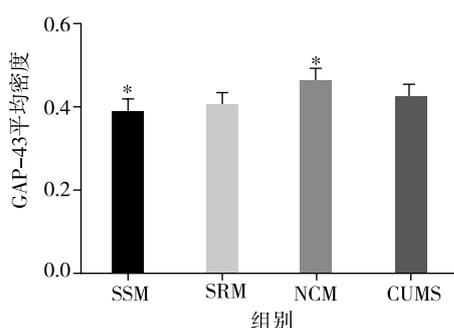
图5 PND90各组大鼠5 min旷场中心区域移动距离比较

2.3 母婴分离及成年后再次应激对大鼠神经可塑性的影响 见图6, 7。母婴分离1周后, 检测大鼠海马的GAP-43, 免疫组化发现3组之间差异无统计学意义($F=1.213, P=0.323$)。成年后再应激, 4组之间差异有统计学意义($F=9.756, P < 0.001$); 与NCM组比较, CUMS组GAP-43表达量下降, 差异有统计学意义($P=0.014$); 与CUMS组比较, SSM组GAP-43表达量减少, 差异有统计学意义($P=0.017$), SRM组和CUMS组比较差异无统计学意义($P=0.201$)。

3 讨论

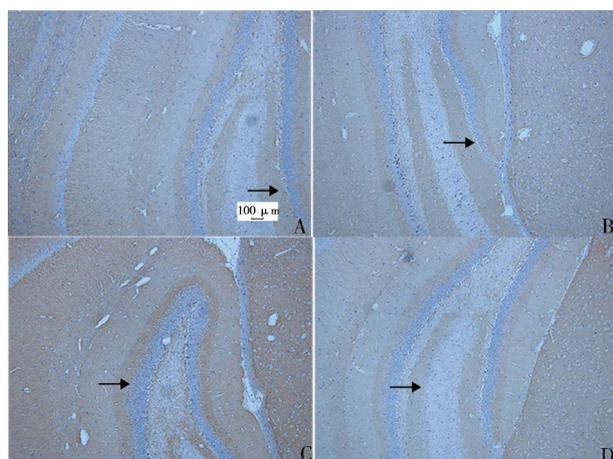
本研究中, 遭受早期母婴分离时间较长的大鼠相比较正常组, 旷场实验活动量减少, 与其他研究一致, 长时间母婴分离的刺激可以导致类似抑郁前期的症状^[4]。早期短暂母婴分离对大鼠成年后的正常行为无明显影响, 15 min短时间分离的模式可能更符合实际情况, 完全不受外界刺激是不存在的, 也许更适合用来作为长时间母婴分离的对照组^[5]。长时间母婴分离, 与正常人相比, 在成年遭受慢性刺激后, 更容易抑郁, 出现行为障碍。母婴分离时间越长, 成年后对环境压力更为敏感。

海马神经发生和苔藓纤维延伸与海马对压力高反应时间重叠(出生后4~14 d), 该时期体内低循环水平的肾上腺皮质酮, 和对压力低肾上腺皮质酮反应, 目的是保护大脑发育关键时刻免受代谢和糖皮质激素的影响。该时期是出生后大脑发育关键时期,



注:与CUMS组比较* $P < 0.01$

图6 PND90各组大鼠海马GAP-43平均密度比较



注: A SSM组, B SRM组, C NCM组, D CUMS组; 箭头所指即为阳性染色

图7 PND90海马GAP-43染色结果

如果经历母婴分离,可激活HPA轴,使HPA轴敏感化^[6],导致成年后压力诱导过度反应产生促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT),这样的改变将持续终身。海马含有丰富的糖皮质激素受体,在HPA轴负性调节中有重要作用。压力或糖皮质激素暴露引起齿状回颗粒细胞发生减少,CA3区锥细胞树突平均长度,树突分支减少^[7-8]。GAP-43在生长发育中的大脑生长锥中含量丰富,轴突生长活跃,在成熟大脑生长中的轴突和突触前末端含量较多。很长时间以来认为GAP-43是蛋白激酶C(PKC)作用底物,GAP-43丝氨酸41位点被PKC磷酸化,对很多细胞内的活动,如轴突生长定位、神经末端细胞骨架调节及突触形成等都有影响^[5, 9-10]。早期母婴分离,对生长发育中的大鼠海马GAP-43表达影响有限,与NCM组相比,母婴分离时间较长的SSM组GAP-43最低,与前人研究^[11]一致,长期母婴分离可能使GAP-43表达有减少的趋势,短期分离则没有这样的影响。本研究早期母婴分离PND11鉴定GAP-43差异并无统计学意义,考虑可能的原因是PND11生长锥含量丰富,表达量减少的差异不显著。其他研究发现GAP-43表达减少,鉴定时间在大鼠青少年^[11]或猿猴成年期^[12],GAP-43表达量随着年龄增加逐

渐减少。CUMS后,长时间母婴分离组相比NCM组GAP-43表达含量明显减少,15 min母婴分离并不影响成年后应激。在CUMS中,HPA轴过度激活,增加循环糖皮质激素的浓度,下调海马的糖皮质激素的受体。慢性压力抑制齿状回的神经形成-海马形成的内在部分,抑制海马GAP-43表达,从而干扰了正常轴突生长和分化,突触形成的过程。人类和动物学研究发现GAP-43+/-存在压力诱导行为退缩、焦虑、自闭等,极有可能和GAP-43异常使突触形成和突触连接障碍,干扰了突触之间的信息传递过程。综上所述,长时间母婴分离使大鼠成年后对应激敏感,GAP-43表达减少,神经可塑性受到抑制。

参考文献

- [1] Latchney SE, Masiulis I, Zaccaria KJ, et al. Developmental and adult GAP-43 deficiency in mice dynamically alters hippocampal neurogenesis and mossy fiber volume[J]. *Dev Neurosci*, 2014, 36(1): 44-63.
- [2] Liu W, Xue X, Xia J, et al. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins[J]. *J Affect Disord*, 2017, 227: 126-135.
- [3] Lyons DM, Parker KJ. Stress inoculation-induced indications of resilience in monkeys[J]. *J Trauma Stress*, 2007, 20(4): 423-433.
- [4] Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4/5): 649-674.
- [5] Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, et al. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats[J]. *Brain Res*, 2002, 950(1/2): 52-63.
- [6] Ménard C, Pfau ML, Hodes GE, et al. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 62-80.
- [7] Rosenfeld P, Wetmore JB, Levine S. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats[J]. *Physiol Behav*, 1992, 52(4): 787-791.
- [8] Kuhn CM, Schanberg SM. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators[J]. *Int J Dev Neurosci*, 1998, 16(3/4): 261-270.
- [9] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(2): 84-91.
- [10] Afadl S, Polaboon N, Surakul P, et al. Prenatal stress alters presynaptic marker proteins in the hippocampus of rat pups[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 470(1): 24-27.
- [11] Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Rees S, et al. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: 'Stroking' stimulation reverses these effects[J]. *Brain Res*, 2007, 1158: 11-27.
- [12] Law AJ, Pei Q, Walker M, et al. Early parental deprivation in the marmoset monkey produces long-term changes in hippocampal expression of genes involved in synaptic plasticity and implicated in mood disorder[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(6): 1381-1394.

(收稿日期: 2017-09-16)