

# 损毁大鼠双侧内嗅皮质对束缚应激反应的影响\*

朱婉儿<sup>1</sup> 李婷<sup>1</sup> 梅垣宏行<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学医学院医学心理学,杭州,310006) (<sup>2</sup>日本名古屋大学医学部老年科,日本)

**摘要** 采用大鼠急性束缚应激动物模型,用鹅羔氨酸损毁大鼠双侧内嗅皮质来建立内嗅皮质损伤模型,观察束缚应激1小时后下丘脑室旁核快反应基因 c-Fos 表达情况以及应激后血浆促肾上腺皮质激素含量的动态变化,并与对照组相比较,探讨内嗅皮质与束缚应激反应的关系。结果表明,损毁内嗅皮质,明显抑制了应激诱导的下丘脑室旁核 c-Fos 的表达和血浆促肾上腺皮质激素含量的上升。结果提示,内嗅皮质参与调节束缚应激反应时 HPA 轴功能。

**关键词** 内嗅皮质,下丘脑室旁核,c-Fos,促肾上腺皮质激素,鹅羔氨酸。

**分类号** B845

## 1 前言

应激这一概念最早是由 H. Selye (1907 ~ 1982) 提出,是指机体在受到各种内外环境因素刺激时所出现的非特异性全身性反应。在末梢主要表现为血中促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、儿茶酚胺等的升高。个体的应激反应主要是通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴而起作用,脑主要通过神经内分泌系统参与对应激的调节<sup>[1]</sup>。在应激的脑调节研究领域中,近年来,快反应基因(immediate early gene, IEG)中的 c-Fos,由于其在脑内的基础发现量很少,但在各种应激状态时能被快速而且一过性地诱导,所以作为神经元的活动和示踪标志,在脑内信号传导,神经核的定位研究中被广泛应用<sup>[2,3]</sup>。研究证明位于下丘脑的室旁核(hypothalamic paraventricular nucleus, PVN)由于是 ACTH 释放因子的主要分泌部位,所以在应激状态的脑内信号传递中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。下丘脑 PVN 的 c-Fos 诱导和末梢血中 ACTH 浓度的升高作为急性应激时的两大特征性指标在应激研究中常被应用<sup>[4]</sup>。在下丘脑以上高位中枢中,已明确边缘系统与应激有关<sup>[5]</sup>。我们曾经报道过海马在应激中的作用,刺激海马的胆碱能神经能引起类似于急性应激的反应,表现为外周血 ACTH 浓度的升

高和下丘脑 PVN c-Fos 表达的增强<sup>[4,6,7]</sup>。我们以往的研究发现,损毁大鼠双侧内嗅皮质,能抑制由束缚应激诱导的血浆 ACTH 含量的上升<sup>[8]</sup>。但损毁大鼠双侧内嗅皮质对由束缚应激诱导的下丘脑 PVN c-Fos 表达的影响并不明确。

本研究利用已建立的大鼠急性束缚应激动物模型,用鹅羔氨酸损毁大鼠双侧内嗅皮质来建立内嗅皮质损伤模型,观察束缚应激1小时后下丘脑 PVN c-Fos 表达情况以及应激后血浆 ACTH 含量的动态变化,并与对照组相比较,旨在结合中枢和末梢两方面的观察指标,探讨内嗅皮质在束缚应激反应中的作用。

## 2 材料和方法

### 2.1 实验动物

28 只雄性 Wistar 大鼠,清洁级,鼠龄 3 个月左右,体重  $280 \pm 20$  g,购于日本 SLC 公司(Japan SLC, Inc)。每只大鼠单笼喂养,控制室温( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ )和光暗周期(12 小时照明/12 小时黑暗,每天早上 7 时开始照明)。适应期间所有动物自由饮食和水。

### 2.2 药品及试剂

鹅羔氨酸(ibotenic acid)和台盼蓝(trypsin-lau):美国 Sigma 公司。兔抗鼠多克隆 c-Fos 抗体:美国 Santa Cruz Biochemistry 公司。ABC 试剂盒和

收稿日期:2005-01-06

\* 本研究得到教育部留学回国人员科研启动基金(J20040252)、浙江省中医药管理局项目(2003C029)和浙江大学人才引进科研启动基金资助。

通讯作者:朱婉儿, E-mail: waner\_zhu@yahoo.com.cn, 电话:0571-87217161

DAB 底物试剂盒:美国 VECTOR 公司。其余化学试剂:日本关东化学公司。

### 2.3 实验程序

**2.3.1 动物分组** 所有动物在饲养 7 天后随机分为 4 组:正常对照组(C)、束缚应激组(I)、生理盐水注射双侧内嗅皮质+束缚应激组(EC)和鹅羔氨酸损毁双侧内嗅皮质+束缚应激组(ES)。每组 8 只。

**2.3.2 内嗅皮质损伤模型建立** 对 EC、ES 组大鼠,用戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔注射麻醉后,将其固定在鼠脑立体定位仪(Narishige,日本)上,充分暴露颅骨后,参照大鼠脑图谱<sup>[9]</sup>,分别在双侧内嗅皮质处(以前卤为零点,AP = - 6.04 mm, ML = ± 6.50 mm, DV = - 7.00 mm)注射 0.2% 台盼蓝生理盐水(EC)或鹅羔氨酸(15 μg/μl 0.2% 台盼蓝生理盐水,ES)。不锈钢注射针被固定在立体定位仪上,其外口直径为 28 μm,一端对向注射部位,另一端通过一根长为 30cm 的硅橡胶管连接着一个 1.0 μl 的注射器。针、导管和注射器内充满着注射液,在确定注射通畅后调节立体定位仪让注射针进入脑组织。注射量为 0.1 μl,速度为 0.1 μl · min<sup>-1</sup>,注射完毕后留针 5 min。手术后的大鼠回原笼恢复 14 天后进行束缚应激造模。

**2.3.3 末梢采血用颈静脉插管** 对各组大鼠于应激造模前一天进行颈静脉插管。在乙醚麻醉下暴露右侧颈静脉,留置经颈静脉右心房插管。硅橡胶插管内充满肝素生理盐水(10U/ml),进入静脉内 2.5cm,以保证其一端进入右心房,另一端打结封闭后固定于头颈背部。插管后的大鼠放回原笼照常喂养。

**2.3.4 急性束缚应激模型建立** 在实验的当天上午 8 时,把所有大鼠随其原笼搬到实验室。对 I、EC、ES 组大鼠,采用绳子捆绑大鼠四肢,使其俯卧固定在木板上,应激 1 小时后松绑放回原笼。为缩小生理周期对激素分泌的影响,全部实验都控制在 10:00 ~ 13:00 之内完成。对 C 组大鼠只是把大鼠搬到实验室里放置,不使其遭受应激,也不让其看到其它大鼠遭应激的场面。

**2.3.5 血浆标本采取** 于实验开始 1 小时前检查静脉插管是否通畅。在实验前即刻、开始后 15min、30min、60min、90min 和 120min 时分别从静脉插管中采取血样 1ml,放入 EDTA 抗凝试管,以 3000rpm 转速离心 20min。取上清血浆冻冷藏于 - 20℃ 冰箱,后用放射免疫方法测定血浆 ACTH 浓度。在采血 1ml 后即刻,回注入 1ml 肝素生理盐水,以避免其

循环血容量的减少。

**2.3.6 心脏灌注** 对各组大鼠在末次采血后用戊巴比妥钠深麻醉,经左心室-升主动脉快速灌注 37℃ 生理盐水 150ml,接着用 4℃ 固定液(4% 多聚甲醛,0.1MPBS 配制,PH 7.4)200 ~ 250ml 灌注,持续 30min 以上。剥离鼠脑,修块,用相同的固定液后固定 24 小时以上后放入 30% 蔗糖溶液(0.1MPBS 配制),4℃ 保存。经脱水后的脑块,用干冰快速冷冻后放入 - 80℃ 低温冰箱保存。染色前使用冰冻切片连续冠状切片,片厚 40μm,片距 120μm(隔三取一),收集于 0.01M PBS 中。

**2.3.7 组织学和免疫组织化学方法** 切片分为 2 组,分别进行常规的 Nissl 染色和 c-Fos 的免疫组织化学染色。Nissl 染色用于确认内嗅皮质神经核团损毁的正确性和有效性,剔除损毁不成功例。c-Fos 的免疫组化染色采用自由漂浮法,具体步骤:0.3% 双氧水/甲醇孵育 30min,以除去内源性过氧化物酶;0.3% Triton-X-100/PBS 孵育 20min;一抗(兔多克隆 c-Fos 抗体,用 PBS/4% 正常山羊血清 1:1000 稀释),4℃ 孵育 24h;二抗(生物素化的羊抗兔 IgG,用 PBS 1:100 稀释),室温孵育 1h;ABC 复合物(用 PBS 1:100 稀释),室温孵育 1h;DAB 显色 5 ~ 10min;各步骤间均用 PBS(0.01M PH 7.4)液漂洗 3 次,每次 5min。脱水、透明、中性树胶封固。PBS 代替一抗作阴性对照。

**2.3.8 c-Fos 染色图像结果分析** c-Fos 染色阳性为细胞核着棕黄色。显微镜下在下丘脑室旁核区域选取视野,计算每 100 μm<sup>2</sup> 组织内的 Fos 阳性细胞数。每张切片测 3 个视野范围(10 × 10 倍),每只大鼠测 3 张切片,阳性颗粒数/切片/视野的平均值作为该大鼠的数值。

**2.3.9 统计学分析** 每组数据均以均值 ± 标准差( $M \pm SD$ )表示。每组 n = 4 ~ 6 只大鼠。对 ACTH 实验数据进行正交多项式比较,按重复测量单因素方差分析(One-way ANOVA),post-hoc 测试采用 Fisher's PLSD 处理。c-Fos 实验数据实行非参数检验的 Kruskal-Wallis H 检验。以  $p < 0.05$  为判断差异显著性的标准。

## 3 结果

### 3.1 化学损毁对神经核团的破坏作用

与用生理盐水注射双侧内嗅皮质相比,使用鹅羔氨酸损毁双侧内嗅皮质后大鼠内嗅皮质处神经元数量明显减少,并伴有神经胶质细胞的明显增加。

详见图 1。

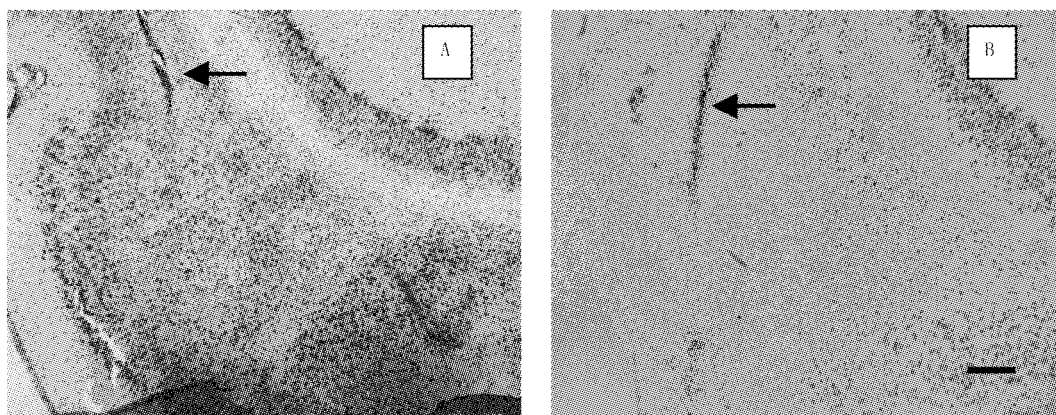


图 1 内嗅皮质区域的 Nissl 染色

注:A:生理盐水注射组;B:鹅羔氨酸损毁组。箭头所示为注射针所到处。Scale bar = 10 mm

### 3.2 损毁双侧内嗅皮质对束缚应激诱导的下丘脑 PVN c-Fos 表达的影响

与用生理盐水注射后应激组(EC)相比,使用鹅羔氨酸损毁大鼠双侧内嗅皮质后应激组(ES)在遭受束缚应激 1 小时后下丘脑 PVN 的 c-Fos 表达明显

减少( $p < 0.01$ , 而与正常对照组之间无明显差异。详见图 2、表 1。

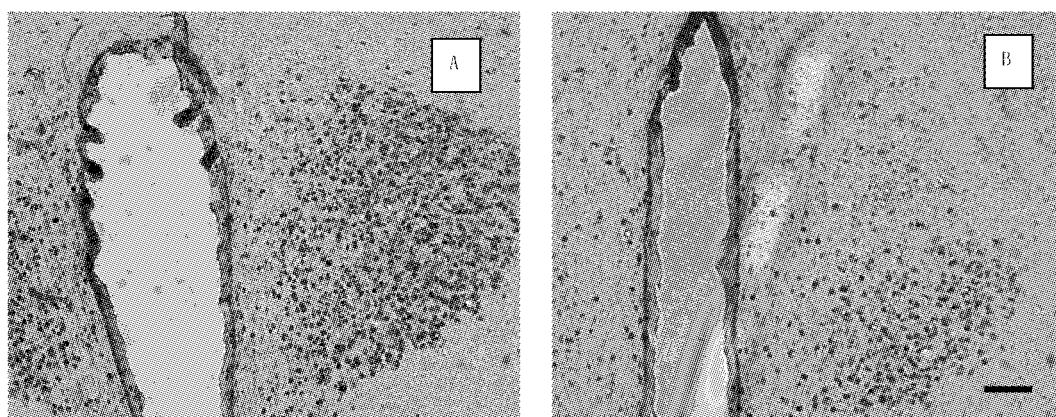


图 2 束缚应激 1 小时后下丘脑 PVN 的 c-Fos 表达

注:A:大鼠双侧内嗅皮质生理盐水注射后应激组(EC);B:大鼠双侧内嗅皮质鹅羔氨酸损毁后应激组(ES)。Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ 。Fos 免疫反应(Fos-IR)阳性神经元的胞核染成棕褐色,大小不等,多为圆形或椭圆形,较大的细胞可见核仁透亮区。

### 3.3 损毁双侧内嗅皮质对束缚应激后血浆 ACTH 浓度的影响

束缚应激组(I)和生理盐水注射双侧内嗅皮质后应激组(EC)在遭受束缚应激后数分钟内即出现血浆 ACTH 浓度的上升,并一直持续,到解除束缚 1 小时后还不能恢复到应激前水平;与此相比,使用鹅羔氨酸损毁双侧内嗅皮质后应激组(ES)在遭受束缚应激后血浆 ACTH 浓度的动态变化过程明显受到抑制,与正常对照组(C)相比无显著差异性。详见图 3。

表 1 束缚应激 1 小时后下丘脑 PVN 的 c-Fos 表达( $M \pm SE$ )

组别	n	FOS-IR 阳性计数
C	3	16.33 $\pm$ 4
I	4	69.23 $\pm$ 4 *
EC	4	63.65 $\pm$ 6 *
ES	4	24.28 $\pm$ 5 #

注: \*  $p < 0.01$  与正常对照组(C)比较; #  $p < 0.01$  与束缚应激组(I)比较。

重复测量单因素方差分析(One-way ANOVA)表明四组间比较具有显著性差异( $p < 0.01$ ), Fisher's PLSD post-hoc 测试显示正常对照组(C)和束缚

应激组(I)、生理盐水注射双侧内嗅皮质后束缚应激组(EC)和鹅羔氨酸损毁双侧内嗅皮质后束缚应激组(ES)差别具有非常显著性意义( $p < 0.01$ ),而正常对照组(C)和鹅羔氨酸损毁双侧内嗅皮质后束缚应激组(ES)、束缚应激组(I)和生理盐水注射双侧内嗅皮质后束缚应激组(EC)的差别无显著性意义( $p > 0.05$ )。

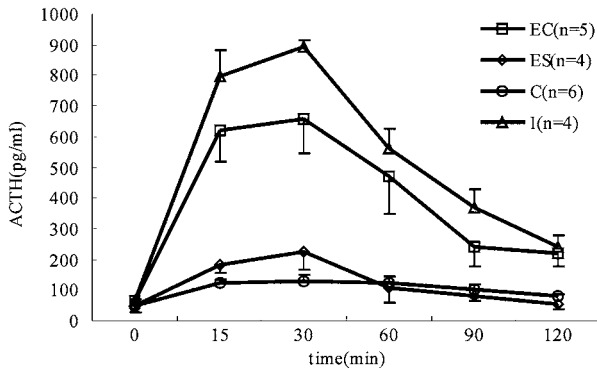


图3 束缚应激状态下血浆 ACTH 浓度的变化(M ± SE)

## 4 讨论

内嗅皮质位于人脑的腹内侧,相当于 Brodmann 第 28 区。其头端始于颞极后,头端内侧与杏仁核相邻,尾端结束于外侧膝状体头端平面,内侧紧连海马的前下托、旁下托,外侧以侧副沟为界与嗅旁皮质相接。由于内嗅皮质和海马之间存在着丰富的双相性神经纤维投射,因此,内嗅皮质被认为是海马和大脑新皮质联系的“桥梁”部位<sup>[10]</sup>。已有研究证明内嗅皮质和海马共同参与记忆的形成过程,临床研究也提示内嗅皮质和情感性疾病及老年性痴呆有关<sup>[11,12]</sup>。已有很多研究报道海马参与应激时 HPA 轴功能的调节,但有关内嗅皮质在应激反应中的作用相对研究较少<sup>[13]</sup>。Sunanda 等研究发现,损毁双侧内嗅皮质可以抑制由慢性束缚应激引起的海马神经元损伤,Uehara 等报道损毁双侧内嗅皮质可以改变杏仁核内由足底电击或心理应激引起的多巴胺神经递质的分泌<sup>[14,15]</sup>。这说明内嗅皮质参与应激反应的调节。

研究证明,当个体处于应激状态时,位于下丘脑的 PVN 便合成和释放多种多肽激素如促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)和加压素,CRH 促进垂体前叶分泌 ACTH,ACTH 使肾上腺皮质合成、分泌糖皮质激素增加,从而有利于机体进行应激反应,以保持机体内环境平衡<sup>[16]</sup>。由此可见,应激时下丘脑 PVN 的激活是末梢血中 ACTH 浓度变化的前提条件。

在预实验中我们发现,与未遭应激的对照组相比,束缚应激 1 小时后,下丘脑 PVN c-Fos 的表达明显增高,同时,外周血中 ACTH 浓度也出现了动态的变化,这与其它此方面的研究报道一致,说明急性应激造模是成功的(数据省略)。在此基础上,用化学的方法损毁双侧内嗅皮质,与用生理盐水“损毁”的对照组相比,损毁内嗅皮质后再遭束缚应激者,下丘脑 PVN c-Fos 的表达和外周血中 ACTH 的升高均出了明显的抑制(图 2,3 所示)。由此可见损毁内嗅皮质的大鼠,对束缚应激的敏感性降低,说明内嗅皮质功能和急性应激时下丘脑 PVN 的激活以及末梢血中 ACTH 浓度的升高有关。但内嗅皮质参与急性应激反应的特异性神经元类型以及其与下丘脑 PVN 之间的信号传导通路等问题尚属未知。同时,由于束缚应激模型中包含有生理应激和心理应激的双重成分,本研究结果提示内嗅皮质参与束缚应激反应,但有关内嗅皮质究竟是参与生理应激或心理应激有关?还是与两者同时有关?等问题也有待于进一步探讨。

本实验结果,结合中枢和末梢两方面的观察指标,证明内嗅皮质参与束缚应激反应时 HPA 轴功能调节。但具体的调节机理有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- Herman J P, Cullinan W E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 1997, 20(2): 78 ~ 84
- Sagar S M, Sharp F R. Early response genes as markers of neuronal activity and growth factor action. *Adv. Neurol*, 1993, 59: 273 ~ 284
- Shao F, Lin W, Wang W, Chen J. The effect of emotional stress on the c-fos gene expression of brain areas (in Chinese). *Acta Psychologica Sinica*, 2003, 35(5): 685 ~ 689  
(邵枫,林文娟,王伟雯,陈极寰. 情绪应激对不同脑区 c-Fos 表达的影响. *心理学报*, 2003, 35(5): 685 ~ 689)
- Zhu W, Umegaki H, Yoshimura J, Tamaya N, Suzuki Y, Miura H, Iguchi A. The elevation of plasma adrenocorticotrophic hormone and expression of c-Fos in hypothalamic paraventricular nucleus by microinjection of neostigmine into the hippocampus in rats: comparison with acute stress responses. *Brain Research*, 2001, 23; 892(2): 391 ~ 395
- Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Rev*, 2001, 22: 502 ~ 548
- Umegaki H, Tamaya N, Shinkai T, Iguchi A. The metabolism of plasma glucose and catecholamines in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol*, 2000, 35: 1373 ~ 1382
- Zhu W, Umegaki H, Suzuki Y, Miura H, Iguchi A. Involvement of

- the bed nucleus of the stria terminalis in hippocampal cholinergic system-mediated activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats. *Brain Res*, 2001, 916: 101 ~ 106
- 8 Umegaki H, Zhu W, Nakamura A, Suzuki U, Takada M, Endo H, Iguchi A. Involvement of the entorhinal cortex in the stress response to immobilization, but not to insulin-induced hypoglycemia. *J. Neuroendocrinol*, 2003, 15(3): 237 ~ 241
- 9 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 1986, Figure 44
- 10 Chrobak J J, Lorincz A, Buzsaki G. Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus*, 2000, 10: 457 ~ 465
- 11 Charles D P, Browning P G, Caffan D. Entorhinal cortex contributes to object-in-place scene memory. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(11): 3157 ~ 64
- 12 De Toledo-Morrell L, Goncharova I, Dickerson B, Wilson R S, Bennett D A. From healthy aging to early Alzheimer's disease: in vivo detection of entorhinal cortex atrophy. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 911: 240 ~ 53
- 13 Eriksson P S, Wallin L. Functional consequences of stress-related suppression of adult hippocampal neurogenesis - a novel hypothesis on the neurobiology of burnout. *Acta Neurol Scand*, 2004, 110(5): 275 ~ 80
- 14 Sunanda, Meti B L, Raju T R. Entorhinal cortex lesioning protects hippocampal CA3 neurons from stress-induced damage. *Brain Res*, 1997, 770(1-2): 302 ~ 6
- 15 Uehara T, Sumiyoshi T, Itoh H, Kurachi M. Modulation of stress-induced dopamine release by excitotoxic damage of the entorhinal cortex in the rat. *Brain Res*, 2003, 989(1): 112 ~ 6
- 16 Viau V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol*. 2002, 14(6): 506 ~ 13

## Effect of Bilateral Entorhinal Cortex Lesion on Stress Response to Immobilization Stress in Rats

Zhu Waner<sup>1</sup>, Li Ting<sup>1</sup>, Hiroyuki Umegaki<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Medical psychology, Zhejiang University Graduate School of Medicine, Hangzhou, 310006, China)

(<sup>2</sup>Department of Geriatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, 466-8550, Japan)

### Abstract

This study was designed to determine the effect of the entorhinal cortex on stress response to immobilization in rats. Neurons in the entorhinal cortex were lesioned by bilateral injection of the cell-selective neurotoxin, ibotenic acid (1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of solution per side). Two weeks later, rats were subjected to immobilization stress. Rats in which ibotenic acid had been injected into the entorhinal cortex showed attenuated expression of c-Fos in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and blunted elevation of plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) after immobilization stress compared with rats in which saline had been injected into the entorhinal cortex. The results of this study indicate that the entorhinal cortex is closely involved in the activation of the HPA axis during immobilization stress in rats.

**Key words** entorhinal cortex, hypothalamic paraventricular nucleus, c-Fos, adrenocorticotrophic hormone, ibotenic acid.