

·基础研究·

运动训练对大鼠缺血性卒中后抑郁的发生及下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的影响*

张一清¹ 朱晓军² 王彤^{1,3}

摘要

目的:观察卒中后抑郁(PSD)大鼠行为学和下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴功能的变化及运动训练的干预作用。

方法:选用健康雄性SD大鼠,随机分为5组:假手术组、卒中组、抑郁组、PSD组、运动组,采用线栓法制备缺血性脑卒中大鼠模型,慢性不可预见性温和刺激和孤养法制备抑郁大鼠模型,将以上方法相结合制备PSD大鼠模型,运动组制备PSD大鼠并同时进行4周跑台训练。观察各组大鼠自发性行为学改变,分别应用Western blot法和ELISA法测定大鼠HPA轴相关激素促肾上腺素释放激素(CRH)、皮质醇(Cort)的含量。

结果:旷场实验(OFT)测定结果显示,抑郁组、PSD组大鼠水平评分和垂直评分减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而且PSD组较卒中组与抑郁组减少更为显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$);抑郁组、PSD组HPA轴激素CRH,Cort分泌亢进($P<0.01$),且PSD组CRH,Cort含量比卒中组与抑郁组增加更明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$);运动组OFT得分增加($P<0.05$),CRH,Cort的过度分泌降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

结论:脑血管损伤的病理基础和慢性应激引起的内分泌紊乱,加重HPA轴亢进和抑郁症状,运动训练可以调节HPA轴,减少PSD的发生。

关键词 脑卒中后抑郁;下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴;运动训练

中图分类号:R743.3, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-04-0306-05

Effects of exercise training on the incidence and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function of ischemic post-stroke depression rats/ZHANG Yiqing, ZHU Xiaojun, WANG Tong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(4): 306—310

Abstract

Objective: To observe the changes in behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal(HPA) axis function of post-stroke depression(PSD) rat model and the effect of exercise training intervention.

Method: Healthy male SD rats were randomly divided into five groups: sham-operation group, cerebral ischemic stroke group, depression group, PSD group, exercise training group. Ischemic stroke rat model was established with reformed Longa method; applying chronic unpredictable mild stimulation and isolation feed were used to make the rat depression model: the combination of the above methods were taken to induce rat PSD model; rats in exercise training group took treadmill training for 4 weeks. The changes in spontaneous behavior of rats were observed and the changes of corticotropin-releasing hormone(CRH), cortisol(Cort) of HPA axis were investigated by using Western-blot and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Result: The open field test(OFT) showed the behavior scores of vertical and horizontal movements in depression group and PSD group decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), in PSD group the scores reduced more than that in stroke group and depression group ($P<0.05$ or $P<0.01$); HPA axis hormones as CRH and Cort, in depression

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.04.002

*基金项目:江苏省兴卫工程重点人才项目[(2007)200]

1 南京医科大学第一附属医院,南京,210029; 2 江苏省省级机关医院; 3 通讯作者

作者简介:张一清,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-10-06

group and PSD group were hyper-secreted ($P<0.01$), in PSD group secretion of CRH and Cort increased significantly than that in stroke group and depression group ($P<0.05$ or $P<0.01$). In exercise training group the OFT score increased ($P<0.05$) and the CRH, Cort secretion reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$).

Conclusion: The pathological basis of cerebral vascular damage and endocrine disorders caused by chronic stress aggravated the HPA axis dysregulation and depressive symptoms. Exercise training could improve the HPA axis abnormalities and decrease the incidence of PSD.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key word post-stroke depression; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; exercise training

脑卒中后抑郁症(post-stroke depression, PSD)是指在脑血管性疾病发生后出现以抑郁为特征或重性抑郁样发作的心境障碍,其发病率占脑卒中患者的20%—79%,严重影响患者的生存质量和康复预后^[1]。下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴的激活是应激反应的主要特征,参与情绪的协调以适应外界压力、刺激等的变化,其功能紊乱是PSD的发病机制之一^[2]。目前缺血性脑卒中(脑梗死)是最常见的脑卒中类型,占全部脑卒中的60%—80%^[3],早期严重的脑损害^[4]和随后的慢性负性压力应激^[5]都可能损伤HPA轴,使HPA轴相关激素促肾上腺素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH),皮质醇(cortisol, Cort)调节障碍,对此已有相关研究报告,但有关PSD与HPA轴之间关系的研究文献却甚少。临床研究发现运动训练促进PSD患者康复^[6],实验证明运动训练通过调节HPA轴可以减轻慢性应激大鼠抑郁程度^[7],但运动是否能够调节HPA轴,减少PSD的发生尚有待研究。本实验通过观察运动训练对PSD大鼠行为学和HPA轴的影响,从康复角度进一步探讨PSD的发病机制,以期为临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级(sprague-dawley, SD)大鼠,雄性,体重230—270g,由南京医科大学实验动物中心提供并饲养,合格证号:SCXK(京)-2006-002。首先进行旷场实验(open-field test, OFT)行为学评分,将水平运动和垂直运动总分低于30分或高于120分的动物剔除,得分相近的大鼠随机分为5组:假手术组、卒中组、抑郁组、PSD组、运动组,每组10只。

1.2 造模方法

1.2.1 假手术组:仅做颈正中切口,分离肌肉、颈总动脉、颈内动脉后,立即缝合皮肤,术后常规饲养4周。

1.2.2 卒中组:采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)^[8]制备局灶性脑缺血大鼠模型。术后采用Longa法^[9]对造模大鼠进行神经功能缺损程度评分,评分为1—3分为造模成功入组,通过随机抽样原则补齐剔除大鼠并重新造模,常规饲养4周。

1.2.3 抑郁组:根据文献方法^[8,10],采用孤养结合慢性不可预见性温和刺激(chronic unpredictable mild stimulation, CUMS)制备抑郁大鼠模型。刺激包括:①禁食、禁水24h;②倾斜鼠笼45° 22h;③昼夜颠倒;④湿笼(100g锯屑加200ml水)22h;⑤4℃—8℃水游泳5min;⑥热环境38℃—39℃ 20min;⑦暴露于特殊气味(空气清新剂)中22h;⑧行为限制20min;⑨夹尾1min,共9种刺激。孤养即单笼饲养。每天随机采取一种CUMS予以刺激,同种刺激不连续出现,使动物不能预知,孤养结合CUMS法处理4周。

1.2.4 PSD组:将MCAO造模成功大鼠术后即单笼饲养,自术后第3天开始,配合CUMS制备PSD模型,连续4周^[8]。

1.2.5 运动组:各组大鼠术前均经过适应性跑步训练3d。运动组大鼠MCAO造模成功后即单笼饲养,术后第3天结合CUMS制备PSD模型,CUMS同时进行跑台运动训练,跑台参数^[11-12]设置如下:平板坡度为0°;传输速度:术前3天,10m/min;CUMS第1天,5m/min;CUMS第2天8m/min;CUMS及以后为12m/min;每天30min,每周5天,连续4周。

1.3 主要试剂与仪器

CRH一抗(Abnova公司,美国),GAPDH一抗(SAB公司,美国),Cort(Abcam公司,英国),Vmax微板分光光度计(MDC公司,美国),96孔平底微量板,低温超速离心机(Eppendorf公司,德国),37℃恒温水浴箱(Grant公司,英国),全自动恒温酶标仪(美国Bio-tek公司,美国),Open-Field敞箱(自制),跑台(成都泰盟科技有限公司)。

1.4 测定方法

1.4.1 行为学指标测定。在运动训练第28天对大鼠采用经典的OFT评分^[8],量化综合分析大鼠行为学改变如活动水平、探索能力,作为评价其是否抑郁的客观指标,本实验采用立柱体敞箱,高40cm,底边长80cm,周壁为黑色,底面划分成面积相等的25块。以动物穿越底面块数(三爪以上跨入)为水平活动得分,反映大鼠运动活动性水平;以直立次数为垂直活动得分,动物两前肢离地1cm以上或攀附壁面次数,反映其兴趣高低。彻底清洁敞箱后再进行下一只大鼠测定,每次测定时间为5min。

1.4.2 HPA轴相关神经递质水平的测定。①血清Cort水平:取血时间为行为学检测次日清晨8时。以10%水合氯醛(4ml/kg体重)腹腔麻醉后,取腹主动脉血2ml,立即低温离心(4℃,13000r/min,10min),吸取血清放置于-80℃冰箱保存,待批量后进行酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测。②下丘脑CRH表达:行为学检测后次日清晨8时,以10%水合氯醛(4ml/kg体重)腹腔麻醉大鼠,断头后快速分离下丘脑,置于-80℃冰箱保存,待批量后均采用Western blot免疫印迹法检测CRH的表达,并按传统方法做内参GAPDH的免疫印迹。

1.5 统计学分析

数据处理实验结果以均值±标准差表示,用统计学软件SPSS 16.0对原始数据进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 运动训练对PSD大鼠行为学表现的影响

与假手术组相比,抑郁组、PSD组大鼠的水平穿越方格数,垂直运动次数明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并且PSD组比卒中组与抑郁组减少更为显著

($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而运动组大鼠的水平活动、垂直活动均较PSD组有明显改善($P<0.05$)。见表1。

2.2 运动训练对大鼠HPA轴相关神经递质的影响

SD大鼠下丘脑CRH相对表达水平测定,检测方法为Western blot法,以GAPDH作为内参。见图1、表2。

SD大鼠血清Cort相对表达水平测定,检测方法为ELISA法。见表3。

实验结果表明,各组内参GAPDH的表达较为一致,与假手术组相比,抑郁组、PSD组大鼠下丘脑CRH表达明显上调,Cort分泌亢进,有显著性差异($P<0.01$)。并且PSD组比卒中组与抑郁组增加更为显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。运动组大鼠的CRH,Cort分泌均较PSD组有明显改善($P<0.05$)。

表1 第28天各组大鼠OFT评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	水平穿越方格数	垂直运动次数
假手术组	10	81.20±10.45	34.42±5.26
卒中组	10	71.13±13.27 ^④	27.00±4.21 ^⑤
抑郁组	10	62.30±7.17 ^{②⑥}	27.00±6.78 ^{③⑥}
PSD组	10	51.88±10.71 ^①	18.00±8.88 ^①
运动组	10	63.22±9.11 ^⑦	27.11±6.29 ^⑦

PSD与假手术组比较:① $P<0.01$;抑郁组与假手术组比较:② $P<0.01$,③ $P<0.05$;卒中组与PSD组比较:④ $P<0.05$;⑤ $P<0.01$;抑郁组与PSD组比较:⑥ $P<0.05$;运动组与PSD组比较:⑦ $P<0.05$

表2 大鼠下丘脑CRH Western blot产物分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CRH	GAPDH	CRH/GAPDH
假手术组	10	14.40±0.70	20.32±2.61	0.721±0.12
卒中组	10	18.80±1.57	20.88±3.41	0.921±0.17 ^③
抑郁组	10	21.84±1.18	20.74±1.73	1.058±0.09 ^{②④}
PSD组	10	27.20±1.21	19.02±1.27	1.434±0.10 ^①
运动组	10	17.74±0.78	20.44±1.98	0.874±0.09 ^⑤

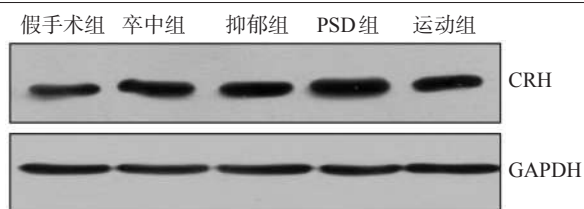
PSD与假手术组比较:① $P<0.01$;抑郁组与假手术组比较:② $P<0.01$;卒中组与PSD组比较:③ $P<0.01$;抑郁组与PSD组比较:④ $P<0.01$;运动组与PSD组比较:⑤ $P<0.01$

表3 ELISA法检测大鼠血清游离皮质醇测定 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Cort(ng/ml)
假手术组	10	78.27±10.69
卒中组	10	111.98±15.08 ^③
抑郁组	10	120.08±21.29 ^{②④}
PSD组	10	146.11±29.98 ^①
运动组	10	116.71±11.31 ^⑤

PSD与假手术组比较:① $P<0.01$;抑郁组与假手术组比较:② $P<0.01$;卒中组与PSD组比较:③ $P<0.05$;抑郁组与PSD组比较:④ $P<0.05$;运动组与PSD组比较:⑤ $P<0.05$

图1 Western blot检测各组大鼠
下丘脑CRH、GAPDH表达



3 讨论

在生理情况下,HPA轴正常分泌Cort有利于保持内环境的稳定,协调人体行为、情绪,适应外界压力、刺激等的变化^[13]。在病理情况下,PSD患者出现Cort含量增高,Cort的节律发生紊乱,HPA轴的分泌亢进^[2]。更深入的研究发现,脑血管病变可引起兴奋性氨基酸释放增多,一方面促进HPA轴启动中枢释放CRH增多^[4,14],另一方面产生神经细胞毒性作用损伤HPA轴负反馈调节中枢海马^[15-16],而脑卒中后期又由于患者躯体神经功能缺损如行动不便,生活圈子缩小等引发慢性持续的负性压力应激使HPA轴调节障碍^[5],产生抑郁。

临床研究发现,运动训练能够减轻PSD患者临床症状,有效提高卒中后日常生存质量^[6],而运动训练可能通过各种途径对发生亢进的HPA轴进行调节,实验证实预防运动训练可以抑制脑梗死兴奋性神经递质过度释放^[17],从而减轻HPA轴启动中枢下丘脑CRH过度分泌;运动保护和促进海马神经细胞生长,实现HPA轴负反馈调节机制的功能重塑^[18];李宁川^[19]发现适宜的运动负荷可以降低心理应激对大鼠下丘脑CRH mRNA表达,来降低应激反应的强度,维持机体生理功能的稳定。

本实验首先通过线栓法制备MCAO模型造成大鼠脑血管急性病理损伤,再运用CUMS结合孤养法模拟恢复期负性压力环境制备PSD大鼠,采用国际通用的跑台训练对脑缺血后运动训练量化,较精确地控制运动强度、运动时间,早期运动训练在促进缺血性脑损伤后神经功能恢复中的作用已被大量的动物实验及临床实践所证实,脑损伤后及时介入康复治疗有效地体现了康复医学旨在加速伤病的恢复进程,预防和减轻其后遗症功能障碍程度的作用。

在脑缺血术前进行适应性训练,术后采用循序渐进的低强度运动训练方案,使脑缺血大鼠能够适应术后的运动训练^[11],持续4周的跑台训练已被证实可明显减小脑梗死体积,促进脑缺血大鼠神经功能恢复^[12]。4周后观察PSD模型大鼠行为学和HPA轴功能的变化,同时探讨运动训练是否能够调节HPA轴,减轻PSD的严重程度。

我们在实验中采用行为学敞箱试验,试验的水平运动反映了大鼠的运动活动性水平,垂直运动反映了大鼠对新鲜环境的好奇程度,即兴趣的高低,28d时抑郁组、PSD组大鼠水平穿越方格数,垂直运动次数明显减少证明抑郁模型、PSD模型可靠。PSD组较卒中组和抑郁组行为学评分降低更为显著,说明PSD的症状程度与早期脑血管病理基础,恢复期慢性应激刺激都息息相关。而运动组大鼠的水平活动和垂直活动次数较多,表明运动训练能改善卒中后大鼠的抑郁状态,预防PSD的发生。CRH由HPA轴启动中枢下丘脑分泌,CRH的高分泌在抑郁症的发病机制中发挥着重要作用^[20],研究认为CRH、Cort浓度能够客观反映抑郁状态和治疗效果^[21],实验结果显示28d抑郁组、PSD组CRH、Cort分泌增高,进一步证明抑郁模型、PSD模型的可靠性,而PSD组较卒中组和抑郁组更为明显,运动干预能抑制CRH过度表达,降低Cort水平。

综上所述,早期脑血管病理损伤和恢复期慢性应激加重PSD大鼠HPA轴亢进和抑郁程度,运动训练可以调节HPA轴,减轻卒中后大鼠抑郁状况,从而有效预防PSD。由于患者PSD发病原因涉及生物、心理、社会等多方面因素,其发病机制尚未明确阐述,PSD大鼠模型能否完全替代患者卒中后抑郁仍存在争议。但轻度、短暂和可控制的刺激可能对情感的产生起良性刺激作用,严重、持久和难以控制的刺激则可能导致症状明显的疾病状态,孤养的环境模拟出脑卒中患者失去社会和家庭支持和交流的状况,故促进或诱发脑卒中后抑郁的发生^[21],复合造模使大鼠自发活动和探究性活动减少与人类脑卒中后抑郁表现相符,HPA轴亢进体现了“反应性机制”学说指导脑卒中后抑郁复合造模的正确性和可行性^[2]。而运动训练具有调节PSD大鼠HPA轴的作用机制,如何制定适宜的运动处方有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Schneider MA, Schneider MD. Recognizing post stroke depression[J]. Nursing, 2012, 42(12):60—63.
- [2] Loubinoux I, Kronenberg G, Endres M. Post-stroke depression: mechanisms, translation and therapy[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(9):1961—1969.
- [3] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J].中国医学前沿杂志(电子版),2010,2(4):4013—4017.
- [4] 何明利,陈曼娥.急性脑缺血边缘系统谷氨酸对HPA轴的调控效应实验研究[J].现代康复,2000,4(2):228—229.
- [5] Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments[J]. Trends Neurosci, 2008, 31(9):464—468.
- [6] Sims J, Galea M, Taylor N, et al. Regenerate: assessing the feasibility of a strength-training program to enhance the physical and mental health of chronic post stroke patients with depression[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2009, 24(1):76—83.
- [7] Fediuc S, Campbell JE, Riddell MC. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats[J]. J Appl Physiol, 2006, 100(6):1867—1875.
- [8] Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, et al. Involvement of serotonin neurotransmission in hippocampal neurogenesis and behavioral responses in a rat model of post-stroke depression [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2010, 95(1):129—137.
- [9] 陈东风,赖真,张少君,等.电针刺激对大鼠脑缺血再灌注后P13-K/Akt通路的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(6):502—504.
- [10] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant[J]. Psychopharmacology(Berl), 1987, 93(3):358—364.
- [11] 徐丽丽,白玉龙,胡永善,等.运动训练改善脑缺血大鼠梗死体积与神经行为能力的实验研究[J].中国康复医学杂志,2008,23(2):100—102.
- [12] 程林,刘楠,张逸仙,等.跑台运动训练对脑缺血大鼠神经功能恢复的影响[J].心血管康复医学杂志,2012,21(3):237—240.
- [13] 沈渔邨.精神病学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2009:663.
- [14] Wang X, Li YH, Li MH, et al. Glutamate level detection by magnetic resonance spectroscopy in patients with post-stroke depression[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2012, 262(1):33—38.
- [15] Kumar A, Zou L, Yuan X, et al. N-methyl-D-aspartate receptors: transient loss of NR1/NR2A/NR2B subunits after traumatic brain injury in a rodent model[J]. J Neurosci Res, 2002, 67(6):781—786.
- [16] Bhargava A, Meijer OC, Dallman MF, et al. Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus[J]. J Neurosci, 2000, 20(9):3129—3138.
- [17] 贾杰,胡永善,吴毅,等.预运动训练对脑梗死大鼠脑内谷氨酸含量及其受体mRNA表达的影响[J].中国运动医学杂志,2008,27(4):443—446.
- [18] Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span[J]. Neurobiol Aging, 2005, 26(4):511—520.
- [19] 李宁川,王金玉,黄美蓉.运动训练对应激大鼠下丘脑CRH mRNA的影响[J].中国体育科技,2006,42(5):82—84.
- [20] Keen-Rhinehart E, Michopoulos V, Toufexis DJ, et al. Continuous expression of corticotropin-releasing factor in the central nucleus of the amygdala emulates the dysregulation of the stress and reproductive axes[J]. Mol Psychiatry, 2009, 14(1):37—50.
- [21] 汤球,刘志学,崔淑芳,等.大鼠抑郁症模型的建立与评价[J].实验动物学,2011,28(1):6—9.

更正

发表于《中国康复医学杂志》2014年第3期282页《语义特征分析在失语症治疗中的应用》一文中,基金项目应为“江苏省科技支撑计划-社会发展(BE2012675)”。