

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.02.003

急性精神应激对 SD 大鼠部分脑区 BDNF 及 CREB 表达的影响

李功迎 马洪霞

(济宁医学院山东省行为医学重点实验室;济宁医学院护理学院,山东 济宁 272067)

摘要 **目的** 研究精神应激后部分脑区内 BDNF、CREB 蛋白表达的时序性变化,进一步探讨 BDNF 对精神应激的保护作用及其机制。**方法** 采用旁观电击大鼠应激模型作为精神应激模型,利用免疫组织化学技术,观察精神应激后海马 CA1 区、前额叶皮质、杏仁核中央核、伏隔核(壳区)、中脑导水管周围灰质、腹侧背盖区等脑区内 BDNF、CREB 蛋白不同时点的表达。**结果** 1)精神应激后即刻各脑区 BDNF 表达明显下调,灰度值明显大于对照组,差异具有极显著性;精神应激后 0.5h、1h BDNF 表达开始恢复,但仍少于对照组,差异有显著性;精神应激后 2h BDNF 表达除 VTA 区外,其余各脑区恢复至对照组水平,两组比较无明显差异;精神应激后 6h BDNF 表达继续增高,明显高于对照组(VTA 区除外),差异有显著性;精神应激后 24h BDNF mRNA 表达达最高值,明显高于对照组,差异有显著性(VTA 区除外,VTA 区表达仍低于对照组)。2)应激后即刻,精神应激组 P-CREB 表达较对照组明显减少,差异具有显著性;随后二者表达逐渐增多,精神应激后 24h 时,精神应激组 P-CREB 表达较对照组明显增多。3)精神应激后即刻、精神应激后 24h 各对应脑区 BDNF 蛋白与 P-CREB 灰度值明显相关($P_{\text{均}} < 0.05$),二者存在明显时空相关性。**结论** 旁观电击大鼠应激模型能产生明显的精神应激;BDNF 参与了机体精神应激状态下的“异稳态平衡”,对精神应激有明显保护作用;BDNF 的保护作用可能是通过 CREB 路径实现的。

关键词 脑源性神经营养因子;cAMP 反应元件结合蛋白;精神应激;免疫组织化学

中图分类号:R33 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)04-084-05

The effects of acute mental stress on expression of BDNF and CREB in some selected brain regions of sprague-dawley rats

LI Gong-ying, MA Hong-xia

(Shandong Provincial Key Laboratory of Behavioral Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To study the dynamic changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cAMP response element binding protein (CREB) gene expression after acute mental stress in some brain regions of rats in order to explore the protective effects and mechanisms of BDNF in mental stress. **Methods** We applied the Communication Box to establish animal model of mental stress and measure the expression of both BDNF and CREB in their CA1 of hippocampus, prefrontal cortex (PF), central amygdaloid nuclei (AG), shell of accumbens nucleus (NAC), periaqueductal gray (PAG), ventral tegmental area (VTA) and Dorsomedial hypothalamic nucleus (DM) using immunohistochemistry methods. **Results** 1) The gray intensity of BDNF protein in the brain regions mentioned above of mental stress group were very significantly higher than that of control group, indicating significantly decreased expression of BDNF protein, at 0.5h and 1h after mental stress. However, there were no significant difference of BDNF protein in almost regions (other than the BDNF mRNA in VTA region) between mental stress group and control group at 2h following mental stress, and mental stress group still decreased relative to that in control group. BDNF protein at 0.5h and 1h higher than at 0h in mental stressed animals. These findings revealed gradual recovery of BDNF during 2 hours following mental stress in the experimental animals. What's more, the expression of BDNF protein obviously increased at 6h following mental stress (other than in VTA region) and reached a strikingly higher level tested at 24h following stress (also other than in VTA region) compared with the control group. Specially, in contrast to other brain regions, VTA region expressed still lowered BDNF but incongruently higher BDNF protein at 24h following mental stress. 2) At the 0h after stress, the expression of P-CREB in mental stress group were significantly decreased than in control group, but at the 24h, they were both significantly increased to a level significantly higher than that in the control group. 3) The gray intensity of BDNF and that of P-

CREB were significantly correlated with each other at both 0h and 24h after stress,implying certain spatio-temporal association between the BDNF and CREB. **Conclusion** The Communication Box model can induce obvious mental stress,and BDNF can bring about protective effects on mental stress,which were involved in the hetero-homeostasis of mental stress. The protective effects of BDNF may be through CREB pathway.

Key words: Brain-derived neurotrophic factor; cAMP response element binding protein; Mental stress; Immunohistochemistry

随着社会竞争的日益剧烈,应激(或称压力, stress)无处不在。应激分为生理应激(也称躯体应激)和心理应激(也称精神应激)。目前,精神应激对于个体而言是更有意义、更值得研究的问题,因为这种应激普遍存在于我们的现实生活中,而包含对躯体刺激的生理应激或纯粹的躯体应激不能很好地模拟现实生活中人类所面临的心理压力或应激^[1]。正如一些人目睹了一些应激事件(如目睹车祸、恐怖事件等),本身未经受任何躯体损伤,但过后一部分人会出现心理或精神障碍。

大量研究证明,机体处于应激状态时,可以引起一系列神经生化、神经内分泌和免疫系统的变化,影响机体内环境的平衡,引起器官功能改变,也会导致机体产生脑结构和功能的可塑性改变^[2-5]。脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)作为一种对多种神经元具有促进分化和再生、增强功能表达及营养、支持、保护作用的碱性蛋白^[4],最近有证据表明 BDNF 与应激、突触可塑性密切相关。但其在精神应激中具体发挥了什么样的作用?其发挥作用的机制是什么?这些问题尚不清楚。

本文选取“旁观电击大鼠应激模型(Communication Box)”^[1,6]这一被认为“纯精神应激”的模型,通过采用免疫组化技术,观察精神应激后海马 CA1 区、前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)、杏仁核中央核(central amygdaloid nuclei, AG)、伏隔核(壳区)(shell of accumbens nucleus, NAC)、中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)、腹侧背盖区(ventral tegmental area, VTA)内 BDNF、CREB 不同时点表达的可塑性变化,探讨 BDNF 对精神应激有无保护作用,以及其保护作用是否通过激活 CREB 途径实现。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,由中南大学湘雅二医院动物实验中心提供,进入实验时的体重为 180~220g。实验动物于实验开始前一周,饲养于昼夜节律 12/12h(8AM~8PM)、通风良好的动物房。环境温度

控制在 22~24℃,动物均能自由饮水和进食。

1.2 实验器材

旁观电击大鼠应激箱(Communication Box)^[1,6]:箱子规格为 60 cm×60 cm×44cm(长×宽×高),箱子四壁由木板做成,其“地板部分”由平行的不锈钢柱(直径:5 mm;相邻两个不锈钢柱的圆心之间的距离为 1 cm)组成,这些不锈钢柱与 220V 电源相连,加一可变电阻,保证电流为 1.5~2.2 mA,并有一手控装置,能随时中断或接通电源。箱内由比较坚硬透明的有机玻璃平均分成 9 个相同的单元格,每个单元格长×宽×高为 20 cm×20 cm×44 cm,箱内每个有机玻璃板距离“地板”6 cm 处有一直径 2 cm 圆孔。最中间单元格内的地板是通电的,其内放置的 SD 大鼠,接受电击,为生理应激鼠(senders rat),最中间单元格的四周单元格的地板是绝缘的,其内放置的 SD 大鼠,不接受电击,而是旁观生理应激鼠遭受电击的过程,通过视觉、听觉、味觉等而产生精神应激,称为精神应激鼠(responders rat)。精神应激鼠本身在躯体上不接受电击,躯体没受到任何损伤,因此这个模型可以较好地用来研究精神应激问题。

1.3 实验方法

共分为 2 组:精神应激组(PS 组)、空白对照组(Control 组)。精神应激组(PS 组)根据观察的时间点分为应激后即刻、应激后 0.5h、1h、2h、6h、24h 6 小组,每组 6 只 SD 雄性大鼠,均为随机分组。另有 5 只老鼠用来交替作生理应激鼠,共 47 只鼠。

1.3.1 应激方法 在旁观电击大鼠模型箱内,生理应激组大鼠接受电击,电流为 1.5~2.2mA,周期 5s,间歇 55s,产生惊叫、惊跳、大小便失禁等反应;精神应激组不接受电击,而是旁观生理应激鼠遭受电击的过程,通过视觉、听觉、味觉等产生精神应激。每次应激在上午 8:00—9:00 进行,每次持续 1h,每日 1 次,共进行 2d。而空白对照组不接受任何应激。

1.3.2 动物处理 每组接受应激后,根据时间点,腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg 体重)麻醉,胸腹腔联合切开,暴露心脏,经左心室插管于升主动脉,剪开右心耳,先用无菌生理盐水 150ml 快速灌注,

直至流出液清亮。然后用 4% 多聚甲醛 250ml 以先快后慢原则灌注固定 30min, 取脑并将脑组织置于相同固定液中后固定 2h(4℃), 再放入 30% 蔗糖液中直至沉底。恒冷冰冻切片机 -20℃ 下连续冠状切片, 片厚 30μm, 参照大鼠解剖图谱, 留取含海马 CA1 区、PF、AG、NAC、PAG、VTA 等以上各脑区的切片。

1.3.3 免疫组化 本研究中免疫组化均是按 ABC 法进行, 具体的试验步骤: 1% H₂O₂ 处理切片 30min, 0.01M PBS 漂洗 5min×3 次, 室温下正常山羊血清封闭 1h 并振荡, 分别加相应一抗(BDNF 一抗工作液浓度为 1/1000; 磷酸化 CREB 一抗工作液浓度亦为 1/1000), 4℃ 孵育过夜。0.01M PBS 漂洗 5min×3 次, 分别加生物素化的二抗(1/100), 2h 后 0.01M PBS 漂洗 5min×3 次。加 ABC 复合物(1/100), 室温下反应 2h, 0.01M PBS 漂洗 5min×3 次, DAB 显色(DAB 0.03%, H₂O₂ 0.01%, 0.01M PBS 配制), 显微镜下控制反应, 显色满意后 0.01M PBS 充分漂洗终止反应。贴片, 常规脱水透明、中性树胶封片。阴性对照是以正常山羊血清取代一抗, 其余步骤不变。

1.4 图像分析

每组每只动物随机选取含有各靶区的原位杂交染色切片与免疫组织化学染色切片各 4 张, 每张切片随机选取 4 个视野。使用 Motic 病理图像分

析系统(厦门麦克奥迪实业集团有限公司)测量阳性神经元的平均灰度值。切片阳性区表达的强弱与灰度值呈负相关, 灰度值大则阳性表达弱, 反之亦然。

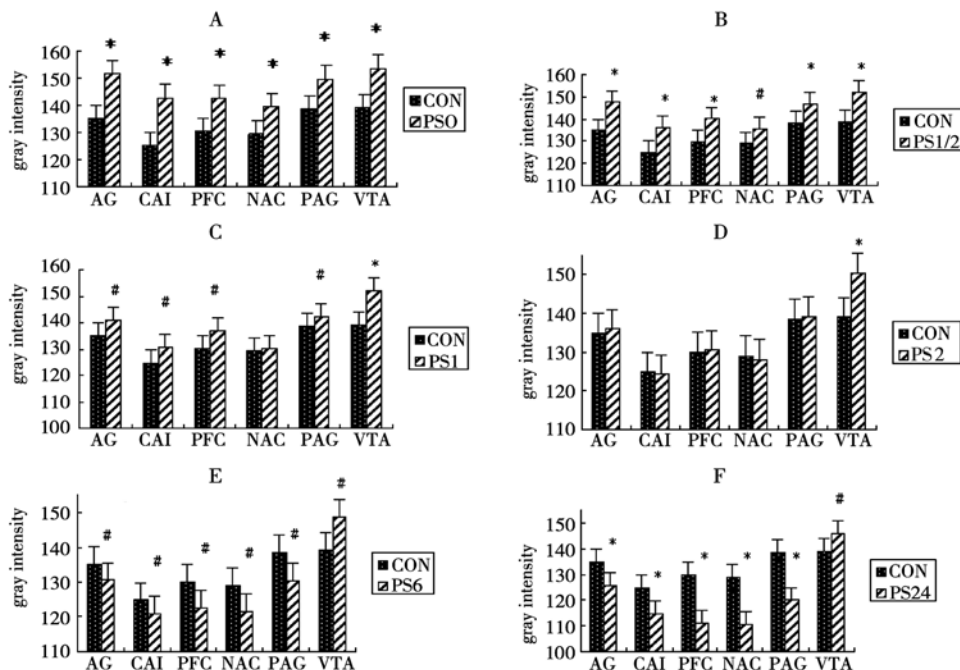
1.5 统计学方法

所有的试验结果除非特殊说明, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数间的比较, 采用方差分析(ANOVA), 两均数之间的比较采用独立样本 *t* 检验。所有的统计分析均采用 SPSS11.5 软件包完成。

2 结果

2.1 精神应激组 BDNF 在各被检脑区内不同时间点的表达

由图 1 A—F 可看出, 精神应激后即刻各脑区 BDNF 表达明显下调, 灰度值明显大于对照组, 差异具有极显著性; 精神应激后 0.5h、1h BDNF 表达开始恢复, 但仍少于对照组, 差异有显著性; 精神应激后 2h BDNF 表达除 VTA 区外, 其余各脑区恢复至对照组水平, 两组比较无明显差异; 精神应激后 6h BDNF 表达继续增高, 明显高于对照组(VTA 区除外), 差异有显著性; 精神应激后 24h BDNF mRNA 表达达最高值, 明显高于对照组, 差异有显著性(VTA 区除外, VTA 区表达仍低于对照组)。



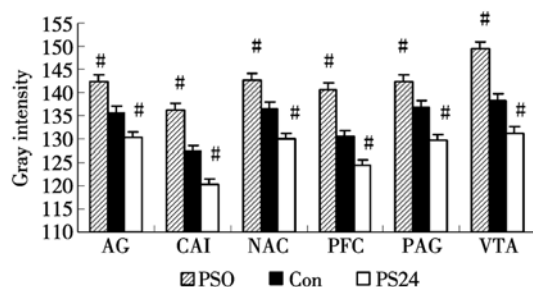
注: 精神应激组: PS0, PS1/2, PS1, PS2, PS6, PS24, 分别代表精神应激后 0 h, 0.5h, 1h, 2h, 6h, 24h; CON: 正常对照组

与对照组比较 $P < 0.05$, * 与对照组比较 $P < 0.01$

图 1 应激后不同时刻精神应激组与正常对照组 BDNF 蛋白在各脑区表达的灰度值

2.2 精神应激组磷酸化 CREB 在各被检脑区内不同时间点的表达

由图 2 可看出,在应激后即刻,精神应激组 CREB 灰度值较对照组明显增大,差异具有显著性,说明应激后即刻精神应激组 CREB 明显低表达,较对照组表达明显减少。随后表达逐渐增多,精神应激后 24h 时,精神应激组 CREB 灰度值较对照组明显减小,差异具有显著性,说明应激后 24h 时,精神应激组 CREB 明显高表达,较对照组表达明显增多。



PS0: 精神应激后即刻; PS24: 精神应激后 24h; CON: 对照组
与对照组比较 $P < 0.05$

图 2 免疫组化检测精神应激组 P-CREB 在各被检脑区内不同时间点的表达

2.3 精神应激后 BDNF 与 CREB 的相关分析

将精神应激后即刻、精神应激后 24h 各对应脑区 BDNF 与 CREB 灰度值作相关分析,精神应激后即刻 BDNF 蛋白与 P-CREB 作 Pearson 相关分析,发现两者明显相关 ($P_{\text{均}} < 0.05$);精神应激后 24h BDNF 蛋白与 P-CREB 作 Pearson 相关分析,亦发现两者明显相关 ($P_{\text{均}} < 0.05$);说明二者存在明显时空相关性。见表 1。

表 1 精神应激后各对应脑区 BDNF 与 CREB 的 Pearson 相关分析(数值均为相关系数)

	AG	CAI	NAC	FC	PAG	VTA
BDNF VS P-CREB						
0h	0.486 ^a	0.512 ^a	0.443 ^a	0.514 ^a	0.373 ^b	0.367 ^b
24h	0.467 ^a	0.498 ^a	0.506 ^a	0.511 ^a	0.415	0.389 ^b

注: a 表示 $P < 0.01$; b 表示 $P < 0.05$

3 讨论

既往有关应激后 BDNF 表达的研究较多,但本研究不同于之前的研究。首先,本研究是采用旁观电击大鼠应激模型研究精神应激鼠 BDNF 的表达;其次,本研究采用免疫组织化学技术同时探讨了大脑多部位、多脑区不同时间点的 BDNF 的表达,

即 BDNF 的时空表达。本研究发现,精神应激后即刻 BDNF 蛋白表达明显下调,与对照组比较差异有极显著性;精神应激后 0.5h、1h BDNF 表达开始恢复,但仍少于对照组,差异有显著性;精神应激后 2h BDNF 表达恢复至对照组水平,两组比较无明显差异;精神应激后 6h BDNF 表达继续增高,明显高于对照组,差异有显著性;精神应激后 24h BDNF 表达达最高值,明显高于对照组,差异有极显著性。以上结果说明,首先精神应激确实对机体造成了损伤,应激后即刻 BDNF 的表达明显减少;其次,精神应激后不同时间,BDNF 在逐渐恢复,2h 时恢复至对照水平,其后仍逐渐增高,至 24h 时达最大值。精神应激时 BDNF 的这种快速表达及快速翻译成蛋白,支持 BDNF 参与了应激反应的观点^[7],同时,考虑到 BDNF 具有对多种神经元有促进生存、分化、再生、增进代谢、增强功能表达、营养、支持、保护及增强突触可塑性^[8]的作用,BDNF 在精神应激后的表达增多,说明 BDNF 在精神应激中发挥了保护作用。这种保护作用的发挥,可能就是通过 BDNF 表达的上调发挥其修饰树突生长,增强突触效能,调节应激环路的功能和反应性等功能实现的^[9]。BDNF 的表达能在这么短的时间内恢复并增加,一方面说明机体对精神应激有自身保护作用,另一方面说明 BDNF 参与了机体精神应激状态下的“异稳态平衡”,个体正是通过这种“异稳态平衡”来尽快摆脱或战胜应激原以使“内稳态平衡”恢复,使机体不出现外显的异常状态。

BDNF 发挥保护作用的可能机制又是如何呢? BDNF 要发挥保护作用,首先要与其受体 trkB 结合,结合后诱导受体二聚化,继而通过酪氨酸残基自身磷酸化激活该酶的活性区。受体的酪氨酸位点磷酸化后能激活许多下游信号通路,如 Ras-MAPK 级联,磷脂酰肌醇激酶(PI-3K)通路及磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)级联^[10]。可能的通路是 Ras-MAPK 通路。Ras 是第 1 个被激活的信号转导蛋白—小 GTP 结合蛋白 Ras,激活的 Ras 引起 C-raf 结合到质膜,并在 Ser217 和 Ser221 位点磷酸化 MEK1 (MAPK 的激酶),引起 ERK1/2 (extra cellular signal-related protein kinase)的磷酸化,ERK1/2 激活 RSK 后,RSK 在 Ser133 磷酸化 CREB,使其与 CBP(CREB 结合蛋白)结合,由此产生扩大的转录信号刺激 Bcl-2 的激活,Bcl-2 为一种抗凋亡蛋白。可见该通路是通过刺激抗凋

亡蛋白的表达,从而发挥保护作用。该通路可简单描述为 $\text{BDNF} + \text{trkB} \rightarrow \text{Ras} \rightarrow \text{MEK1} \rightarrow \text{MAPK} \rightarrow \text{ERK1/2} \rightarrow \text{P-CREB} \rightarrow \text{Bcl-2}$ 。由此通路可看出 BDNF 可以通过多种信号级联激活 CREB, CREB 再进而放大信号,从而发挥保护作用。本文发现精神应激后即刻 P-CREB 明显减少,应激后 24h 时较对照又明显增多,BDNF 的时空表达和 CREB 的时空表达两者是一致的;并且发现精神应激后即刻和精神应激后 24h BDNF 和 P-CREB 及二者 mRNA 对应脑区的灰度值都存在明显正相关。本研究结果也验证了以上提出的通路假设。Conti 等^[11]通过对 CREB 基因突变鼠和野生鼠的研究亦发现,BDNF 的时空表达和 CREB 的活动是互相平行的,与本研究结果类似。

参考文献:

- [1] 李功迎,李凌江,马洪霞. 精神应激与生理应激对 SD 大鼠焦虑行为影响的比较[J]. 中国行为医学科学, 2008, 17(12): 948-950.
 - [2] Burrone J, OByrne M, Murthy VN. Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons[J]. Nature, 2002, 420: 414-418.
 - [3] Rossi EL. Stress-induced alternative gene splicing in mind-body medicine[J]. Adv Mind Body Med, 2004, 20: 12-19.
 - [4] Alfonso J, Frick LR, Silberman DM, et al. Regulation of Hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments[J]. Biol Psychiatry, 2006, 59(3): 244-251.
 - [5] McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, et al. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord[J]. J Neurosci, 1998, 18(14): 5354-5365.
 - [6] Yutaka Gomita, Motoo Yamori, Katsushi Furuno, et al. Influences of psychological stress produced by intraspecies emotional communication on nicorandil plasma levels in rats[J]. Pharmacology, 1989, 38: 388-396.
 - [7] Loudes C, Petit F, Kordon C, et al. Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures[J]. Neuroendocrinology, 2000, 72: 144-153.
 - [8] Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation[J]. Learn Mem, 2003, 10: 86-98.
 - [9] Marmigère F, Choby C, Rage F, et al. Rapid stimulatory effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on somatostatin release and intracellular calcium rise in primary hypothalamic cell cultures[J]. Neuroendocrinology, 2001, 74: 43-54.
 - [10] Pardon MC, Roberts RE, Marsden A, et al. Social threat and novel cage stress-induced sustained extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation but differential modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of NMRI mice[J]. Neuroscience, 2005, 132: 561-574.
 - [11] Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, et al. cAMP response element-binding protein is essential for the up-regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs[J]. The Journal of Neuroscience, 2002, 22(8): 3262-3268.
- (收稿日期 2013-04-06)
-
- (上接第 79 页)
- [13] Jeronimo C, Bastian PJ, Bjartell A, et al. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance[J]. Eur Urol, 2011, 60(4): 753-766.
 - [14] Liu Q, Zhang C, Sun A, et al. Tumor-educated CD11b^{high}Ia^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I[J]. J Immunol, 2009, 182(10): 6207-6216.
 - [15] Shi SB, Ma TH, Li CH, et al. Effect of maintenance therapy with dendritic cells: cytokine-induced killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. Tumori, 2012, 98(3): 314-319.
 - [16] Ishikawa T. Immunoregulation of hepatitis B virus infection-rational and clinical application. Nagoya J Med Sci, 2012, 74(3-4): 217-232.
 - [17] Vitaliti G, Pratico AD, Cimino C, et al. Hepatitis B vaccine in celiac disease: yesterday, today and tomorrow. World J Gastroenterol, 2013, 19(6): 838-845.
 - [18] Translational research and experimental medicine in 2012. Lancet, 2012, 379(9810): p1.
 - [19] Kaiser J, National Institutes of Health. A government niche for translational medicine and drug development. Science, 2010, 330(6010): 1462-1463.
 - [20] Campbell RM, Dymshitz J, Eastwood BJ, et al. Data Standardization for Results Management/[S]. Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, et al. Assay Guidance Manual[MD]. 2004: 1-18.
- (收稿日期 2013-03-15)