

不同急性应激反应大鼠模型的比较

胡 越,熊威威,谭 毅,黄志华,李爱国,蒋奕红

(桂林医学院附属医院麻醉科,桂林 541001)

【摘要】 目的 比较三种急性应激反应动物模型应激相关指标的变化,探讨建立相对适宜的急性应激反应模型。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 40 只,随机数字表法分为正常组(I)、断尾组(II)、烧伤组(III)和截肢组(IV),每组 10 只。正常组不做处理,断尾组在靠近尾端的尾干处(即 S3 和 S4 脊髓神经之间)横切,烧伤组制成 30% 体表面积 III 度烫伤模型,截肢组以左下肢截肢作为严重创伤应激。应用酶联免疫法检测各组大鼠血清促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和皮质醇(corticosterone, CORT)的含量,免疫组织化学方法检测下丘脑 c-fos 蛋白的表达水平。**结果** 与 I 组相比,II、III、IV 组 ACTH、CORT 水平均升高($P < 0.05$),c-fos 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。与 III 组相比,II、IV 组 ACTH、CORT 水平、c-fos 蛋白表达较高($P < 0.05$);但 II 组与 IV 组各项指标相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 通过低位尾干切断制作急性应激反应模型,具有操作步骤简单、致伤程度较一致、应激效果明显等特点,能够较客观地反映人类遭遇突发事件时的应激反应,是较为理想的急性应激反应的建模方式。

【关键词】 急性应激反应;大鼠;模型;断尾

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 12-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.010

Comparison of different rat models of acute stress response

HU Yue, XIONG Wei-wei, TAN Yi, HUANG Zhi-hua, LI Ai-guo, JIANG Yi-hong

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

【Abstract】 Objective To compare three rat models of acute stress response and to explore an ideal experimental rat model for research of acute stress response. **Methods** A total of 40 clean grade male SD rats were randomly (by random number) divided into 4 groups ($n = 10$ each): Normal group (group I), caudal trunk transection group (group II), burn group (group III), and amputation group (group IV). The group I received no special treatment, the group II received inferior caudal trunk transection at the level between sacral spinal nerve 3 and 4 (S3, S4), the group III was inflicted with 30% total body surface area (TBSA) grade 3 burn on the back, and the group IV had an amputation of the left lower limb as severe traumatic stress. Rats in each group were killed at 30 minutes after treatment and blood samples were collected for measuring serum adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) levels by ELISA. The c-fos protein expression in hypothalamic tissue was examined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the group I, serum ACTH and CORT levels, and hypothalamic expression of c-fos protein in the group II, III, IV were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the group III, serum ACTH and CORT levels, and hypothalamic expression of c-fos protein were significantly higher in the group II and IV ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the group II and IV ($P > 0.05$). **Conclusions** The preparation of acute stress response model induced

[基金项目] 2012 年广西高等学校科研项目(编号:201204LX243);2014 年桂林市科学研究与技术开发计划课题(编号:20140310-2-3)。

[作者简介] 胡越(1989-),女,硕士研究生,研究方向:围术期应激反应调控的研究。E-mail: needpaper@163.com。

[通讯作者] 蒋奕红(1969-),女,主任医师,研究方向:临床麻醉学(复合麻醉、麻醉与应激)研究。E-mail: jiangyihong@163.com。

by inferior caudal trunk transection has simple operation steps and produces a traumatic injury to a similar degree, and quite well reflects the acute stress response in humans caused by sudden accident. Therefore it is a quite good method to establish acute stress response and deserves further investigation.

【Key words】 Acute stress response; Rat; Model; Docking tail; Inferior caudal trunk transection

近几十年,全球地震、洪水等自然灾害频繁发生,各种大型集会活动出现拥挤和踩踏事件,均造成大规模的人员伤亡,应激与疾病的关系已引起人们的重视。进行急性应激反应的研究,首先要复制标准的、重复性强的急性应激反应动物模型,但对于急性应激反应的动物模型的制作,目前国内外尚缺乏统一标准。当前研究急性应激的模型有束缚、烧伤、电击、截肢、模拟腹腔探查术等模型,根据斯坦福急性应激反应问卷(SASRQ)评分结果得知,创伤性骨折、烧伤诱发急性应激反应较其他类型创伤更为严重^[1,2],因此截肢和烧伤模型是研究急性应激反应的常用模型,但因其造模步骤较复杂,不可避免会复合多种刺激给实验结果造成干扰。断尾模型多应用于疼痛研究,而其在急性应激反应的研究目前鲜有报道。本实验通过比较以上 3 种造模方法,观察血清 ACTH、CORT 浓度和下丘脑 c-fos 蛋白表达的变化,探讨较适宜研究急性应激反应病理生理变化的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 40 只,SPF 级,体重 280~310 g,由桂林医学院实验动物中心提供,许可证号[SCXK 桂 2013-0001]。受试动物在桂林医学院实验动物中心动物房饲养,许可证号[SYXK 桂 2013-0001]。自由饮水摄食,保持动物笼具清洁干燥,适应环境 7 d 后进行实验研究。将大鼠按随机数字法分成正常组(I)、断尾组(II)、烧伤组(III)和截肢组(IV),每组 10 只。

1.2 主要试剂与仪器

大鼠 ACTH、CORT ELISA 试剂盒(Cusabio 公司),兔抗人多克隆 c-fos 抗体(1:1000, Santa Cruz 公司),SAB 试剂盒(武汉博士德生物技术公司),DAB 试剂盒(Sigma 公司),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Olympus BX51 显微镜(Olympus 公司),石蜡切片机(德国 Leica 公司),微量加样枪(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 动物模型分组与制备

为消除麻醉药物对机体应激反应的保护作用,

各组操作前均腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)。参考文献的方法, I 组采用低位尾干切断(inferior caudal trunk transection)的方法模拟急性应激,即用鼠笼固定大鼠后,在靠近尾端的尾干处(S3 和 S4 脊髓神经之间)横切^[3]; II 组备皮后于 92℃ 水温中浸烫 18 s 造成 30% 体表面积(TBSA) III 度烫伤模型^[4]; IV 组于左下肢足面上约 0.5 cm 处行截肢技术,术后无菌纱布包扎^[5];正常组不做处理。各组均于模型建立 30 min 后处死动物,检测有关指标。

1.4 血清 ACTH、CORT 浓度的检测

为排除皮质醇昼夜节律性的干扰,实验中取血时间控制在上午 12 点左右。模型建立后 30 min,常规胸腹联合切口,开胸后经右心房用不凝管取血 5 mL,血样室温放置 2 h 后,3500 r/min, 4℃ 离心 15 min,取上清液 -20℃ 保存,采用 ELISA 试剂盒检测 ACTH 和 CORT 含量,严格按照试剂盒说明操作。

1.5 下丘脑组织免疫组织化学染色

取血后即刻经左心室依次用 0.9% 生理盐水、4% 多聚甲醛灌注大鼠后,断头取脑,置于 4% 多聚甲醛固定液中 4℃ 保存,48 h 后行梯度酒精脱水、二甲苯透明、56℃ 浸蜡、包埋。石蜡连续切片直至切到下丘脑部位,常规脱蜡至水,浸泡 3% H₂O₂ 和去离子水,孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性。滴加正常山羊血清工作液,孵育 30 min,滴加 c-fos 兔抗人抗体(1:1000) 4℃ 过夜,滴加生物素化标记二抗工作液,辣根过氧化物酶链霉卵白素工作液,DAB 显色 3~5 min,苏木素复染、返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,拍照。每组 10 只大鼠,每只大鼠选取 2 张切片观察,每张切片随机取 5 个高倍视野(×200)算得阳性细胞总和,采用 Olympus BX51 显微镜(Olympus 公司)拍照并计数 c-fos 阳性细胞数。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法)检验,

以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血血清 ACTH、CORT 含量

与 I 组相比, II、III、IV 组 ACTH、CORT 水平均升高 ($P < 0.05$)。与 III 组相比, II、IV 组 ACTH、CORT 水平较高 ($P < 0.05$); II 组与 IV 组相比, 两组间的 ACTH 和 CORT 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清 ACTH 和血清 CORT 含量 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Contents of serum ACTH and CORT in the rats

组别 Groups	ACTH(pg/mL)	CORT(ng/mL)
I 组	41.99 ± 2.39	85.24 ± 4.11
II 组	87.24 ± 5.85 ^{ab}	153.35 ± 6.16 ^{ab}
III 组	55.19 ± 2.13 ^a	123.18 ± 2.87 ^a
IV 组	89.15 ± 3.97 ^{ab}	155.08 ± 5.71 ^{ab}

注: 与 I 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 III 组比较, ^b $P < 0.05$
Note. Compared with the group I, ^a $P < 0.05$; compared with the group III, ^b $P < 0.05$.

2.2 各组下丘脑组织 c-fos 蛋白表达情况

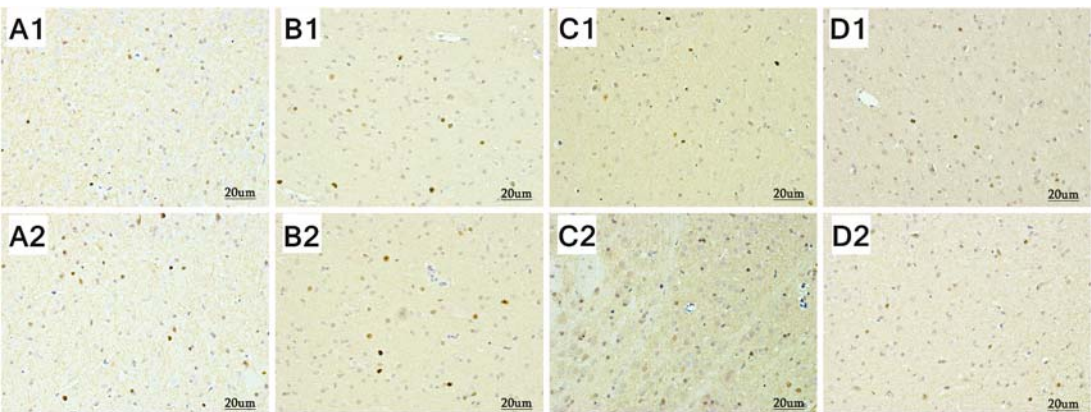
各组大鼠下丘脑 c-fos 蛋白均有表达, 阳性细胞呈暗棕黄色, 胞核染色。结果显示, I、II、III、IV 组 c-fos 蛋白阳性细胞量分别为 (51.00 ± 3.74)、(148.80 ± 6.09)、(94.70 ± 5.70) 和 (152.40 ± 4.17)。与 I 组相比较, II 组、III 组和 IV 组 c-fos 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$); 与 III 组相比, II、IV 组 c-fos 蛋白表达水平较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); II 组与 IV 组的 c-fos 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。

3 讨论

理想的动物模型是急性应激反应研究的基础, 应该与临床产生应激的机制相近, 模拟突发状况对机体造成的创伤。动物存活时间足够长, 不影响做后续的实验研究。模型制作简单, 诱导因素单一, 模型重复性好, 造成急性应激的同时尽量避免触发其他应激源对应激指标结果的干扰。临床上创伤患者大多由交通意外、殴打、工作意外、火灾等致伤, 因此本实验选择具有代表性的创伤性骨折模型和烧伤模型与新型断尾模型比较, 通过对比各组大鼠建模成功后促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和皮质醇 (CORT) 水平, 下丘脑 c-fos 蛋白表达水平来评估各组动物的应激状态。

在实验动物的血样收集过程经常伴有其他应激源刺激, 比如束缚^[6], 从而影响结果的准确性。颈静脉置管为多次采血提供了可能性, 且采血量充足, 适用于慢性应激反应的研究。一般为了实验的顺利进行, 会选择术前 7 天置管, 对急性应激反应的研究而言, 这就是弊端。导管的固定影响实验动物的舒适度和灵活性, 且导管本身作为一种异物可能会引发炎症反应, 产生应激, 进一步影响 HPA 轴的功能^[7]。为了使本研究结果更有说服力, 我们对各组大鼠断头后立即心脏取血 5 mL, 血量充足便于 ACTH 和 CORT 检测, 同时也尽量减少无关应激反应。

机体受到创伤后, 下丘脑-垂体-肾上腺皮质 (HPA) 轴激活, 外周血中促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和皮质醇 (CORT) 水平迅速升高。本实验



注: A 正常组; B 断尾组; C 烧伤组; D 截肢组; 1-2: 各组 2 个视野

图 1 下丘脑 c-fos 蛋白表达 (标尺 = 20μm)

Note. A1, A2: Normal group; B1, B2: Docking tail group; C1, C2: Burn group; D1, D2: Amputation group.

Fig. 1 c-Fos expression in the rat hypothalamus (Bar = 20μm)

结果显示,Ⅱ组、Ⅲ组、Ⅳ组血清 ACTH 和 CORT 水平相对 I 组明显升高,即各组急性应激反应模型均制备成功。严重烧伤对于机体而言是一种强烈的刺激,烧伤创面坏死组织持续存在、烧伤后继发炎症反应、机体的体液丢失等一系列应激源同时或相继作用,会进一步诱发应激。实验中发现,Ⅱ组与Ⅲ组作用效果比较时,Ⅲ组 ACTH、CORT 水平略低于Ⅱ组,说明烧伤组应激水平低于断尾组。对实验动物行烧伤处理大多选择麻醉后备皮再行热水烫伤,整个造模过程中必不可少复合了束缚应激,加之水浴烫伤对大鼠的烧伤面积和深度难以准确把握,需经病理切片证实,因此烧伤模型的制备是复合应激的过程,涉及到各种应激源的综合作用,用来模拟突发、不可预料的急性创伤不如断尾模型。一些学者偏爱对大鼠行截肢处理建立急性应激反应模型,即麻醉后固定体位,于左侧腹股沟处切开皮肤,游离出股动、静脉及其他分支血管再于膝关节上方 1.2 cm 处截肢。这种方式可以避免大鼠出血过多诱发休克,因为休克本身也会诱发机体产生应激反应,影响大鼠实验室指标的结果。本实验为了使应激反应更单纯,选择的截肢方式较直接,无需结扎血管,选择相对远心端的部位。研究结果显示,Ⅱ组与Ⅳ组相比应激水平差异无统计学意义,且实验中发现Ⅱ组出血量比Ⅳ组较少,证明断尾模型可以模拟创伤断肢患者的应激反应,更适合作为急性应激反应的模型。

正常情况下,神经元内的 c-fos 蛋白水平很低,一旦出现应激源刺激则可诱发 c-fos 在 10 min 之内进行表达。已有文献证实^[8],下丘脑室旁核(PVN)部位的 c-fos 蛋白能调节促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)的表达,通过调节 CRH 的表达,进而控制促肾上腺皮质激素(ACTH)的分泌,启动 HPA 轴,影响与应激有关的行为。本研究发现,与 I 组相比,Ⅱ组、Ⅲ组和Ⅳ组 c-fos 蛋白表达明显增高,Ⅲ组 c-fos 蛋白略低于Ⅱ和Ⅳ组,Ⅱ组与Ⅳ组的 c-fos 蛋白水平差异无统计学意义,说明 c-fos 表达趋势和 ACTH、CORT 这两个应激的关键指标有明显一致性,提示了上述因子参与了急性应激反应的发生和发展,也进一步地证实了三

组大鼠均造模成功,断尾是相对理想的造模方式。

国内外早有应用断尾作为外周神经疼痛的模型^[9],本课题组发现低位尾干切断模型大鼠的行为表现与人体创伤性骨折在感觉变化和症状上的表现相似。断尾模型造模关键步骤简单,致伤程度较一致,可重复性高以及术后并发症少,应激相关指标表达显著,能够较客观地反映人类遭遇突发状况时的应激反应。综上所述,相比于烧伤和截肢模型,断尾模型是较适宜应用于研究急性应激反应的制模方法。

参考文献:

- [1] 李阳,陈长香. 斯坦福急性应激反应问卷在创伤性骨折患者中的应用[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 11(06): 717-722.
- [2] 孙月吉,张淑玲,刘启贵,等. 烧伤患者可疑急性创伤后应激障碍及其相关因素分析[J]. 中国临床康复, 2005, 9(28): 54-57.
- [3] Xu B, Descalzi G, Ye HR, et al. Translational investigation and treatment of neuropathic pain [J]. Mol Pain, 2012, 8(1): 1-8.
- [4] 万义福,许宝华,张玉珍,等. 大鼠严重烧伤后心肌细胞 GRP94 表达变化及其意义[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(02): 43-47.
- [5] 杨志红,钟历勇,王惠. 创伤应激对糖尿病大鼠 TNF- α 、IL-6、NO 及氧化应激的影响[J]. 内科急危重症杂志, 2004, 10(4): 197-199, 211.
- [6] 王逸,卢聪,宋广青,等. 慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(02): 40-44.
- [7] Thanos PK, Cavigelli SA, Michaelides M, et al. A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm [J]. Physiol Res, 2009, 58(2): 219-228.
- [8] 张云东,朱佩芳,王正国,等. 大鼠严重创伤后早期下丘脑 c-fos 和 CRH mRNA 的表达[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(11): 965-967.
- [9] Na HS, Han JS, Ko KH, et al. A behavioral model for peripheral neuropathy produced in rat's tail by inferior caudal trunk injury[J]. Neurosci Lett. 1994, 177(1-2): 50-52.

[修回日期]2016-09-06