

母婴分离应激对 rd 新生小鼠行为的影响

张传领¹, 邸桐², 王文婧³, 牛丽丽², 肖瑞²

(1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学分子病理学重点实验室, 呼和浩特 010110;
3. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

【摘要】目的 rd 小鼠是一种出生 1 周左右自发致盲的遗传性视网膜变性小鼠。通过母婴分离应激实验, 检测其对 rd 新生小鼠的焦虑样和抑郁样行为的影响, 初步评价 rd 小鼠能否成为眼部疾病与焦虑抑郁研究新的模型。**方法** 将出生第 1 天的 rd 小鼠分为母婴分离组($n=9$)和对照组($n=9$)。母婴分离组每天与母鼠分离 4 h, 共分离 28 d。从第 29 天开始行为测试实验, 通过 Smart3 动物行为跟踪软件检测母婴分离组和对照组在旷场实验和十字高架实验中的焦虑样行为, 在强迫游泳实验和悬尾实验中的抑郁样行为。**结果** 在旷场实验中, 母婴分离组在旷场中心的时间比例(0.88%)和运动距离(28.17 ± 5.65 cm)均明显少于对照组(2.61% , 109.9 ± 9.79 cm; $P=0.04$, $P=0.001$); 在十字高架实验中, 母婴分离组在开放臂的时间(40.64 ± 4.13 s)明显少于对照组(91.73 ± 11.26 s, $P<0.01$); 在强迫游泳实验中, 母婴分离组的不动时间(126.5 ± 10.22 s)明显多于对照组(77.75 ± 16.83 s, $P=0.02$); 在悬尾实验中, 母婴分离组的不动时间(21.56 ± 6.83 s)多于对照组(7.37 ± 3.22 s, $P=0.03$)。**结论** rd 小鼠母婴分离 28 d 应激, 能够明显增加 rd 小鼠的焦虑样行为和抑郁样行为。

【关键词】 rd 小鼠; 母婴分离; 开放场实验; 十字高架实验; 强迫游泳实验; 悬尾实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 04-0089-05
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.04.015

Effect of maternal separation stress on behavior of neonatal rd mice

ZHANG Chuan-ling¹, DI Tong², WANG Wen-jing³, NIU Li-li², XIAO Rui²

(1. School of Pharmacy, Inner Mongolian Medical University, Huhhot 010110, China;
2. Key Laboratory of Molecular Pathology, Inner Mongolian Medical University, Huhhot 010059;
3. School of Life Sciences and Biopharmaceutics; Shenyang Pharmaceutical University; Shenyang 110016)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of maternal separation stress on the behavior of neonatal rd mice. **Methods** Neonatal rd mice were divided into maternal separation (MS) group ($n=9$) and control group ($n=9$). MS-stress was induced in the MS group by 4-hour-separation per day for 28 days. Open field test, elevated plus maze test, forced swim test and tail suspension test were used to evaluate the anxiety-like and depression-like behavior of the neonatal rd mice. **Results** The stay time and distance travelled of MS group in the central zone were 0.88% and 28.17 ± 5.65 cm, respectively, significantly shorter than that of the control group (2.61% , 109.9 ± 9.79 cm. $P=0.04$, $P=0.001$). Compared with the control group, the stay time in open arms of the MS group was significantly decreased ($P<0.01$), while the immobility time in forced swim test and tail suspension test of the MS group were 126.5 ± 10.22 s and 21.56 ± 6.83 s, significantly longer than that of the control group (77.75 ± 16.83 s, $P=0.02$, 7.37 ± 3.22 s, $P=0.03$). **Conclusions** The 28-day maternal separation stress can significantly increase the anxiety-like and depression-like behavior

[基金项目] 国家自然科学基金(编号 31260260), 内蒙古医科大学博士启动基金(编号: nybq2010zcl)。

[作者简介] 张传领(1978-), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向: 民族药理学, 神经药理学。

[通讯作者] 肖瑞(1979-), 女, 博士, 教授, 主要研究方向: 分子病理, 神经退行性疾病, E-mail: xiaorui79@hotmail.com。

in neonatal rd mice.

【Key words】 rd mice, neonatal; Maternal separation; Stress; Open field test; Elevated plus maze test; Force swim test; Tail suspension test; Anxiety-like behavior; Depression-like behavior

人类生活早期应激(early life stress, ELS),是诱发焦虑、抑郁等多种精神疾病的重要风险因素。流行病学的研究表明那些在身体和情感上受到伤害儿童在发育过程中具有很高的焦虑障碍^[1,2]和抑郁症风险^[3]。ELS 动物模型已经广泛的应用于研究精神类疾病机理中。动物研究显示,母婴分离导致动物行为异常而出现焦虑和抑郁样反应^[4]。目前主要有两种常用的产后处理方法来模拟早期生活应激,早期剥夺(early deprivation (ED)和母子分离(maternal separation, MS)。母子分离方式包括每天将新生动物和其母亲短时间分离 1 h^[5,6]和 3~6 h 的长时间分离^[7]持续 1~3 周。母子分离应激在猪、豚鼠和鸟类中都有所使用,最广泛的是应用在大鼠和小鼠上。经历 MS 对实验动物成年后的神经、内分泌、免疫系统以及精神行为具有广泛的影响。生命早期不良应激对神经发育的影响逐步引起关注,母婴分离逐渐成为了研究精神类疾病的有效工具,特别是研究生命早期不良应激对抑郁症的病理过程的影响正逐步成为研究热点^[8]。国内外对于母子分离实验研究主要使用的正常大小鼠,极少用患有某种生理疾病的老鼠进行实验。Rd 小鼠作为一种在哺乳期就因视网膜退化而失明的小鼠,在研究母婴分离应激中尚未有相关研究报道。中国是全世界盲人最多的国家,据世界卫生组织 2010 统计,中国盲人(blind)824.8 万,低视力(low vision)6727.4 万,视力残疾(visual impairment)是两者的总和 7551.2 万^[9]。本实验试图为从小致盲人群在外界应激作用下行为变化提供基础的实验结果。为盲人抑郁症治疗和护理提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

rd 小鼠, rd1 (PDE6brd1; CBA/J) 小鼠购自南京大学模式生物所(动物生产许可证号:SCXK(苏)2015-0001;于内蒙古医科大学分子病理学重点实验室配种饲养,循环光照(光照 12 h,黑暗 12 h),环境温度约为 25℃,无菌环境下饲养。Smart3 动物行为跟踪系统(Pan lab, 西班牙), 敞箱(自制,边长 45 cm,高 50 cm), 十字高架(自制,臂长 66 cm,高 50 cm), 烧杯(1 000 mL), 悬尾装置(自制), 摄像机

(索尼,日本)。

1.2 方法

1.2.1 母子分离应激设计:雌雄 Rd 成年鼠 2:1 合笼交配,待雌鼠怀孕后单笼饲养。生产后选 9 只新生 rd 鼠(5 只雄性,4 只雌性)实验组即母婴分离组(ms),从出生第 1 天起(P1),每天上午(9:00~13:00)与母鼠分离 4 h,之后放回母鼠身边。共分离 28 d。分离期间幼鼠禁食禁水。对照组新生小鼠 9 只不做任何处理。母婴分离应激结束后即第 29 天开始进行行为学测试。

1.2.2 旷场实验(open field test, OFT):将待测 rd 小鼠放入测试房间适应 1 h,后将 rd 小鼠放入旷场反应箱的中央部位。用摄像机记录下 rd 小鼠 5 min 内在旷场内的活动情况。后用 Smart3 小动物识别跟踪系统的旷场实验模块进行跟踪分析。计算 rd 小鼠在测试时间内运动总路程(total distance traveled),中央区域总路程,在中央区域(center zone)停留时间与总时间的百分比等参数。

1.2.3 十字高架迷宫测试(elevated plus-maze test, EPMT):将待测 rd 小鼠放入测试房间适应 1 h。后将 rd 小鼠放入十字高架中心区(central area),头面对开放臂。有摄像机记录下 rd 小鼠 5 min 内在十字高架内的活动情况,用 Smart3 小动物识别跟踪系统的十字高架模块进行跟踪分析 rd 小鼠在测试时间内进入开臂和闭臂的次数和在两臂滞留时间。

1.2.4 强迫游泳实验(forced swim test, FST):将待测 rd 小鼠放入测试房间适应 1 h。后将 rd 小鼠放入 1000 mL 大烧杯中,水温为 26℃,水深为 12 cm。有摄像机记录下 6 min 内 rd 小鼠烧杯内的活动情况,然后用 Smart3 小动物识别跟踪系统的强迫游泳模块进行跟踪分析不动时间。

1.2.5 悬尾实验(tail suspension test, TST):将待测 rd 小鼠放入测试房间适应 1 h。后将 rd 小鼠尾部后 2 cm 处用胶带固定,悬挂于支架上,计时 6 min 后停止。用 Smart3 小动物识别跟踪系统的悬尾实验模块进行跟踪分析 rd 小鼠在测试时间内的不动时间进行统计。

1.2.6 数据分析:测定值用均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ s)表示。采用 GraphPad Prism 6 软件分析,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 旷场实验

母婴分离组(MS)组平均总运动路程为 2106 ± 249.7 cm 对照组(control)平均总运动路程为 2797 ± 211.9 cm。母子分离组走过的总路程比对照组短,两组统计学上差异有显著性($P = 0.049$)。MS 组和对对照组在周围区域运动路程分别为 (2077 ± 247.4) cm 和 (2687 ± 206.0) cm,两组统计学上差异没有显著性($P = 0.074$)。而在中间区域运动路程两组差异有非常显著性($P < 0.0001$),MS 组的平均运动距离为 28.17 ± 5.65 cm,而对照组在中间区域的平均运动距离为 (109.9 ± 9.79) cm(图 1)。从小鼠在中间区域停留时间占总时间的百分比看,MS 组为 0.88%,对照组为 2.61%,两组差别有显著

性($P = 0.0015$)(图 2)。

2.2 十字高架实验

在 rd 小鼠进入开放臂次数方面,MS 组(13.80 ± 2.51)次与对照组(12.20 ± 1.11)次差异没有显著性($P = 0.78$)(图 3)。而 rd 小鼠在开放臂的时间来看,ms 组(40.64 ± 4.13)s 明显少于对照组(91.73 ± 11.26)s(图 4)。

2.3 强迫游泳

母婴分离组在强迫游泳实验中的平均不动时间为 (126.5 ± 10.22) s,对照组为 (77.75 ± 16.83) s,母婴分离组明显多于实验组($P = 0.02$)(图 5)。

2.4 悬尾实验

母婴分离组在强迫游泳实验中的平均不动时间为 (21.56 ± 6.83) s,对照组为 (7.37 ± 3.22) s,母婴分离组明显多于实验组($P = 0.03$)(图 6)。

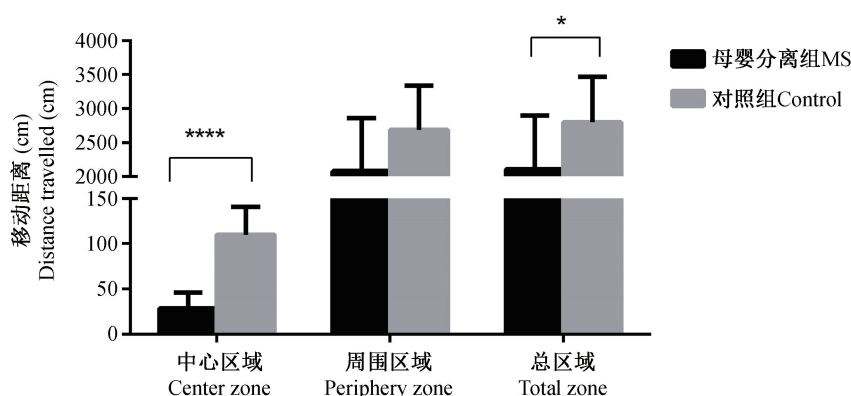


图 1 rd 小鼠在开放场中的运动距离比较

Fig. 1 Traveled distance of rd mice in open field test

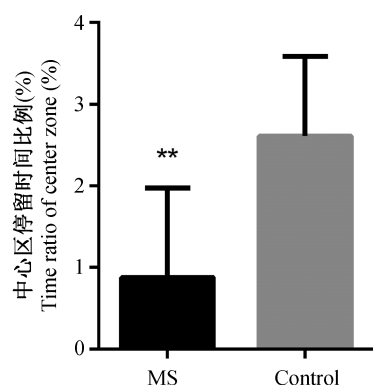


图 2 母婴分离组 (MS) 与对照组 (control) 在开放场中心区停留时间比例

Fig. 2 Time ratio of center zone vs total zone of the two groups mice in open field test

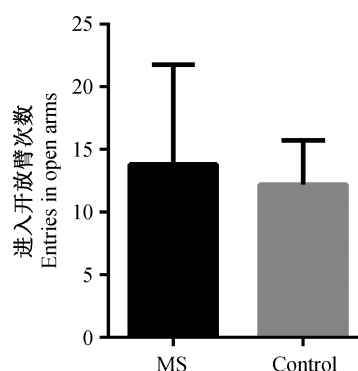


图 3 母婴分离组 (MS) 与对照组 (control) 小鼠在十字高架中进入开放臂次数

Fig. 3 Entries in the open arms between MS and control groups

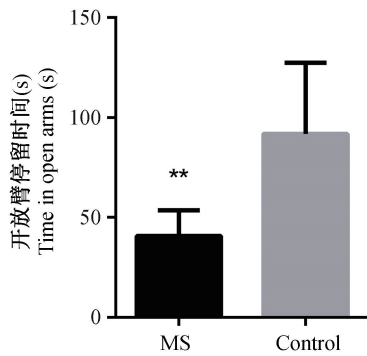


图 4 母婴分离组 (MS) 与对照组 (control) 小鼠在开放臂停留时间

Fig. 4 Time in open arms between the MS and control groups

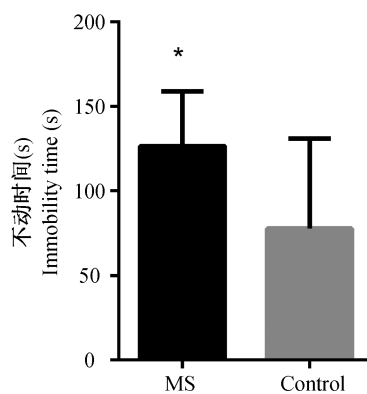


图 5 母婴分离组 (MS) 与对照组 (control) 强迫游泳中不动时间

Fig. 5 Immobility time between the MS and control groups in force swim test

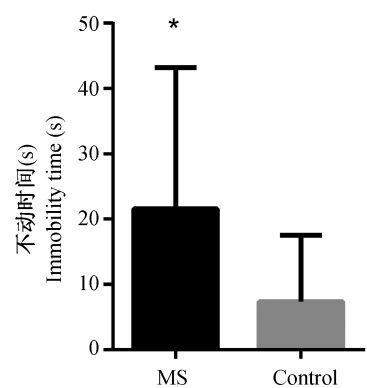


图 6 实验组 (MS) 与对照组 (control) 在悬尾实验中不动时间

Fig. 6 Immobility time between the MS and control groups in tail suspend test

虑样行为的常用的方法,旷场区域要比鼠笼大很多,啮齿类动物天生倾向于靠近有壁的地方活动,而避免在中心不可预测的地方活动。测量它们在中心区域的探究行为是和焦虑相关的指标^[10,11]。本实验在 rd 小鼠在周边路程在没有显著性差异情况下,停留在中心区域的时间,中心区域运动距离和总运动距离母婴分离组明显少于对照组,从开放场结果看,rd 小鼠母婴分离后焦虑样行为更明显。

十字高架实验是评估啮齿类动物焦虑样反应的很受欢迎的方法。十字高架有一对闭合臂和一对开放臂构成,高架离地面 50 cm,实验利用小鼠对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧形成矛盾冲突来考察小鼠的焦虑状态。用小鼠在开放臂的次数和时间来衡量其焦虑状态^[12,13]。本实验结果表明,母子分离组进入开放臂的时间要比对照组要少,说明母子分离让 rd 小鼠比正常组小鼠表现出更多的焦虑样行为。

强迫游泳实验是进行抗抑郁药初步筛选和判断啮齿类动物抑郁样行为的有效测试实验,实验将实验对象放到灌水的圆柱体中,造成不可逃脱的环境,以测试时间内啮齿类动物不动时间作为指标^[14]。本实验在强迫游泳的结果中显示母子分离 rd 小鼠 28 d,增加了 rd 小鼠的抑郁样行为。

悬尾实验是基于小鼠被悬尾后,在一种短期的无法逃脱的有害环境中,产生绝望,表现出静止不动。该实验用于评估小鼠的抑郁样行为^[15,16]。本实验结果显示母子分离组 rd 小鼠较对照组抑郁样行为明显增加。

临床和流行病学调查显示失明和眼部疾病与抑郁症和焦虑有广泛的联系^[17,18]。如何进行动物学实验方面的研究一直没有合适的动物品系。Rd 小鼠具有视网膜变性基因病变,在出生后第 7 天左右视网膜退化导致小鼠失明。而国内外关于母子分离实验选取生理正常的大小鼠进行,其结果在不同品种大小鼠之间结果也缺乏稳定的一致性^[19]。本实验结果显示遗传性致盲小鼠在母子分离应激中也表现出更高的焦虑样和抑郁样行为。rd 小鼠能否成为研究眼部疾病与焦虑和抑郁的新的动物模型,需要在机制上进一步在研究。

参考文献:

- [1] Felitti VJ, Anda RF, Nordenberg D, Williamson DF, et al. Relationship of childhood abuse and household dysfunction to

3 讨论

旷场实验又称敞箱实验,是测试啮齿类动物焦

- many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study [J]. *Am J Prev Med*, 1998, 14(4): 245–258.
- [2] Gibb BE, Chelminski I, Zimmerman M. Childhood emotional, physical, and sexual abuse, and diagnoses of depressive and anxiety disorders in adult psychiatric outpatients [J]. *Depress Anxiety*, 2007, 24(4): 256–267.
- [3] Springer KW, Sheridan J, Kuo D, et al. Long-term physical and mental health consequences of childhood physical abuse: results from a large population-based sample of men and women [J]. *Child Abuse Negl*, 2007, 31(5): 517–530.
- [4] Uys JD, Marais L, Faure J, et al. Developmental trauma is associated with behavioral hyperarousal, altered HPA axis activity, and decreased hippocampal neurotrophin expression in the adult rat [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1071: 542–546.
- [5] Wilber AA, Southwood CJ, Sokoloff G, et al. Neonatal maternal separation alters adult eyeblink conditioning and glucocorticoid receptor expression in the interpositus nucleus of the cerebellum [J]. *Dev Neurobiol*, 2007, 67(13): 1751–1764.
- [6] Wilber AA, Wellman CL. Neonatal maternal separation-induced changes in glucocorticoid receptor expression in posterior interpositus interneurons but not projection neurons predict deficits in adult eyeblink conditioning [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 460, 214–218. 460: 214–218.
- [7] Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, et al. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(10): 3091–3098.
- [8] 林泽斯, 王洪琦. 肠易激综合征母婴分离模型应用进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(4): 434–439.
- [9] Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment; 2010 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(5): 614–618.
- [10] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463: 3–33.
- [11] Stanford SC. The open field test: reinventing the wheel [J]. *J Psychopharmacol*, 2007, 21: 134–135.
- [12] Pellow S, Chopin P, File SE, et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat [J]. *J Neurosci Methods*, 1985, 14: 149–167.
- [13] Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(8): 1193–1205.
- [14] Adem C, David T, Todd DG. The mouse forced swim test [J]. *J Vis Exp*, 2012, (59): 36–38.
- [15] Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85(3): 367–370.
- [16] John FC, Cedric M, Annick V. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29: 571–625.
- [17] Bazargan M, Hamm-Baugh VP. The relationship between chronic illness and depression in a community of black elderly persons [J]. *J Gerontol Soc Sci*, 1995, 50B(2): 119–127.
- [18] Augustin A, Sahel JA, Bandello F, et al. Anxiety and depression prevalence rates in age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 1498–1503.
- [19] Rachel A. Millstein, Andrew Holmes. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2007, 31: 3–17.

[修回日期] 2016–11–28