

郑建华,陈菁青,董巧燕,等. 慢性束缚肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 190-201.

ZHENG J H, CHEN J Q, DONG Q Y, et al. Construction and evaluation of a mouse model of chronic restraint intestinal stress injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 190-201.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.006

慢性束缚肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价

郑建华,陈菁青,董巧燕,法云智*,邱业峰*

(军事医学研究院实验动物中心,北京 100071)

【摘要】 目的 结合社会心理应激导致炎症性肠病、肠易激综合征等一系列疾病的特点,建立实验性慢性束缚小鼠肠道应激损伤模型,为探讨慢性束缚应激诱导胃肠病的致病机制以及防治措施奠定基础。**方法** 18 只雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠,适应 7 d 后,根据体重按随机数字表法分为 2 组,对照组及慢性束缚应激组。对小鼠进行束缚应激,每天 3 h,连续束缚 14 d,建立肠道损伤模型。通过观察体重、肠道组织病理形态变化、检测紧密连接蛋白表达、肠上皮细胞凋亡以及炎症细胞因子 mRNA 表达水平等指标对模型进行评价。**结果** 慢性束缚应激 14 d,小鼠表现为体重减轻,十二指肠绒毛高度变短、隐窝结构异常、绒毛/隐窝比下降;结肠黏膜炎性细胞浸润、隐窝结构不规则。蛋白免疫印迹、免疫组化和免疫荧光染色结果显示,慢性束缚应激后小鼠十二指肠和结肠紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-1 表达显著下降 ($P < 0.05$);肠上皮细胞凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 的表达显著增加 ($P < 0.05$)。此外,肠道炎症因子和趋化因子 mRNA 表达结果显示,慢性束缚应激 14 d 显著提高了小鼠十二指肠 *IL-1 β* 、*IL-6*、*MCP-1*、*TNF- α* 、*IL-10* 基因的表达 ($P < 0.05$);慢性束缚应激 14 d 显著提高了小鼠结肠 *IL-1 β* 、*IL-6*、*MCP-1* 的表达 ($P < 0.001$)。**结论** 利用小鼠行为限制装置对小鼠连续束缚 14 d,导致应激小鼠肠道组织结构异常、肠屏障功能障碍、肠上皮细胞凋亡,引发肠道炎症反应,表明慢性束缚应激肠道损伤小鼠模型构建成功。

【关键词】 慢性束缚应激;肠道应激损伤;肠道屏障;模型评价;细胞凋亡;炎症反应

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0190-12

Construction and evaluation of a mouse model of chronic restraint intestinal stress injury

ZHENG Jianhua, CHEN Jingqing, DONG Qiaoyan, FA Yunzhi*, QIU Yefeng*

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Corresponding author: QIU Yefeng. E-mail: qiuyefeng2001@163.com; FA Yunzhi. E-mail: fyzc2004@163.com

【Abstract】 Objective Given that psychosocial stress can contribute to a series of diseases, such as inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome, we aimed to establish an experimental chronic restraint mouse intestinal stress injury model as a basis for exploring the pathogenic mechanism of chronic restraint stress-induced gastrointestinal diseases, and for developing preventive and curative measures. **Methods** Eighteen male SPF-grade BALB/c mice were acclimatized for 7 days and then divided into a control group and a chronic restraint stress group according to body weight, using a randomized numerical table method. The mice were subjected to restraint stress for 3 hours per day for 14 days to establish an intestinal injury model. The model was evaluated by observing body weight, pathological changes in intestinal histomorphology, expression of tight junction proteins, apoptosis of intestinal epithelial cells, and mRNA expression levels

【基金项目】 军队实验动物专项科研课题(SYDW-KY[2021]06)。

Funded by the Specialized Scientific Research Projects for Military Laboratory Animals (SYDW-KY[2021]06).

【作者简介】 郑建华,男,在读硕士研究,研究方向:实验动物模型创制研究。Email:zjhcbm0311@163.com

【通信作者】 法云智,男,硕士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:fyzc2004@163.com;

邱业峰,男,博士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:qiuyefeng2001@163.com。

* 共同通信作者

of inflammatory cytokines. **Results** After 14 days of chronic restraint stress, model mice showed weight loss, shortened duodenal villus height, abnormal crypt structure, a decreased villus/crypt ratio, colonic mucosal inflammatory cell infiltration, and irregular crypt structure. Protein immunoblotting, immunohistochemistry, and immunofluorescence staining showed that the expression levels of the duodenal and colonic tight junction proteins Occludin and Claudin-1 were significantly decreased in mice after chronic restraint stress ($P < 0.05$), while expression levels of the apoptotic protein cleaved-caspase-3 in intestinal epithelial cells were significantly increased ($P < 0.05$). Regarding the mRNA expression levels of intestinal inflammatory factors and chemokines, chronic restraint stress for 14 days significantly increased the gene expression levels of interleukin (*IL*)-1 β , *IL*-6, monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP*-1), tumor necrosis factor- α , and *IL*-10 in the duodenum of mice ($P < 0.05$), and significantly increased the gene expression levels of *IL*-1 β , *IL*-6, and *MCP*-1 in the colon ($P < 0.001$). **Conclusions** The use of a behavioral restriction device to restrain mice continuously for 14 days led to abnormal intestinal tissue structure, intestinal barrier dysfunction, and intestinal epithelial cell apoptosis, and triggered an intestinal inflammatory response in the stressed mice, indicating successful establishment of a mouse model of intestinal injury by chronic restraint stress.

[Keywords] chronic restraint stress; intestinal stress injury; intestinal barrier; model evaluation; apoptosis; inflammatory response

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着生活节奏的加快,人们在工作、生活和教育方面所承受的压力也在不断增加^[1]。应激反应是机体受到内外环境刺激时产生的非特异性反应^[2],参与肠易激综合征、功能性胃肠病、焦虑及抑郁等诸多身心疾病的发生发展^[3],对部队作战能力生成和维持构成了重大威胁,是非战斗减员的主要原因^[4-5]。有调查研究表明,25%的美国人口受到高水平的压力,而 50%的参与者报告在过去一年中经历了重大的压力事件^[6],我国成人抑郁障碍终生患病率高达 6.8%^[7]。据报道,慢性应激源不仅是重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)等精神疾病,也包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)等肠道疾病的危险因素。临床报告显示,胃肠道症状可能使抑郁症复杂化,抑郁症患者胃肠道疾病恶化的风险更高^[8],胃肠道疾病的风险增加,可能会导致精神障碍,如抑郁和焦虑、精神分裂症、痴呆和自闭症等^[9]。此外,应激在诱发心血管疾病、脑损伤、皮肤和胃肠道疾病中的作用先前已被记载^[10]。长期应激可能导致免疫功能下降、糖尿病、冠心病、肾衰竭和高血压等疾病的发生^[11],应激在功能性腹胀、肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)、炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)等肠道疾病发展中起关键作用^[12-14]。IBS 是全科医生最常遇到的胃肠道疾病之一^[15],各国普通人群肠易激综合征患病率差异较大,大洋洲国家为 11% ~ 17%,非洲国家为 10%,亚洲国家为 5% ~ 10%,此外,有研究表明我国 IBS 患病率为 1.4% ~ 11.5%^[16-18]。应激是机

体在生存竞争中的一种本能的防御机制,但长期慢性应激则会引起全身多系统多部位病理表现^[19-20]。

束缚应激最初是由 Bonfils 在 1993 年提出的^[21],在许多研究中,其已被广泛用于模拟心理应激^[6,21]。有研究表明,持续数周的束缚应激刺激可导致实验动物的大脑异常、肠道功能障碍和生态失调^[9]。肠屏障的破坏可导致肠通透性增加、肠道微生物群组成的变化和炎症增加,这种肠道内稳态的失调可以促进癌的发生^[22-23]。此外,越来越多的证据表明,束缚应激损伤肠道并引起如 IBD、IBS 等疾病^[6]。慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)导致肠损伤的发病机制复杂,目前尚不清楚。IBD 是一种慢性致残性胃肠道疾病,目前认为是由过度活跃的免疫系统攻击胃肠道引起,导致溃疡和炎症。然而,束缚应激诱导 IBD 的发病机制尚不清楚^[6],一种可能的解释是肠屏障损伤,即应激源可能会损伤肠道屏障,导致细菌移位和局部或全身炎症反应等后果^[10,24]。免疫调节功能障碍在炎症性肠病等慢性炎症性疾病的发病机制中起着重要作用,但其潜在的机制仍不清楚^[25]。

目前能够复制精神心理应激的动物模型中,较为成熟的是 CRS 模型,以往研究表明,CRS 对动物脑、心脏、肝、肾、胃肠等的损伤有加重作用,能够引起多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[10-11,26]。CRS 是一种生理应激源,主要用于神经科学研究,如建立大鼠或小鼠的抑郁模型,慢性束缚应激动物模型在研究抑郁症方面日趋成熟,然而,CRS 诱导肠屏障损伤研究较少。

已有研究证明,束缚 4 h、1 d 或 4 d 血浆皮质酮水平显著上升,炎症因子及紧密连接蛋白未见显著性差异^[27-28],而长时间束缚应激导致胃肠破坏和肠粘膜通透性增加^[10,21,29],CRS 可影响大鼠的肠道屏障功能,如粘液损伤和肠道通透性增加、细菌过度生长和营养物质渗漏^[30]。然而,目前对 CRS 条件下肠道损伤的了解还不够全面。多数 CRS 相关研究中,着重于抑郁症模型构建研究,肠道损伤评价指标单一,聚焦于肠损伤的研究较少,因此,需要一种应激强度足够、肠应激损伤明显的小鼠慢性束缚肠应激损伤动物模型,为慢性肠道疾病发病机制的进一步研究奠定实验基础。本研究中,利用小鼠行为限制装置对小鼠进行束缚应激,每天 3 h,连续束缚 14 d,构建慢性束缚应激肠道损伤小鼠模型,并对造模结果进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只雄性 7 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,体重 21 ~ 23 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。所有小鼠饲养于本单位实验动物中心 SPF 级屏障环境中【SYXK(军)2022-0022】,恒温在 23 ± 2 °C,相对湿度 40% ~ 60%,明暗交替时间 12 h/12 h,自由采食和饮水。所有器材、垫料、饲料等均在使用前进行高压灭菌处理。所有实验操作符合动物福利伦理,并通过军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准(IACUC-DWZX-2022-049)。

1.1.2 主要试剂与仪器

TRIgent 试剂盒(货号:MF034-05)与 qRT-PCR Mix(货号:MF787-01)均购自北京聚合美生物科技有限公司;逆转录试剂盒(货号:RR047A)购自 TaKaRa BIO;基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;HE 染液套装(货号:G1003)、EDTA (PH9.0)抗原修复液(货号:G1203)、组织自发荧光淬灭剂(货号:G1221)、抗荧光淬灭封片剂(货号:G1401)、DAPI 染色试剂(货号:G1012)、牛血清白蛋白 BSA(货号:GC305010)、CY3 标记山羊抗兔 IgG(货号:GB111402)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;Occludin(货号:#91131)、Cleaved Caspase-3(货号:#9661)抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;Claudin-1 抗体(货号:37-4900)购于 Invitrogen 公

司;ZO-1(货号:21773-1-AP)抗体购于 Proteintech 公司;ECL 超敏发光液(加强型)(货号:HXP1868),BCA 蛋白定量试剂盒(货号:LOT:HX351691)均购于北京华兴博创基因技术有限公司; β -actin(货号:ab8227)抗体购于 abcam;DAB 显色试剂盒(20X)(货号:ZLI-9018)、酶标山羊抗兔 IgG 聚合物(货号:PV-6001)购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, C1000 Touch™;美国);组织匀浆机(Roche MagNALyser Instrument, #03358968001;德国);核酸蛋白定量仪(NanoPhotometre, N50-Touch;德国);标准规格酶标仪(Bio-Rad, #1681130;美国);全波长酶标仪(SpectraMax ABS plus;美国);ChemiDoc 成像系统(Bio-Rad, ChemiDoc Imaging System;美国);病理石蜡切片机(Leica, RM2016;德国);组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5;中国);显微镜以及成像系统(Nikon, NIKON DS-U3;日本);明场、荧光 FISH 数字病理扫描仪(Leica, Aperio VERSA;德国);正置光学显微镜(Nikon, Nikon Eclipse E100;日本)。

1.2 方法

1.2.1 分组

所有实验小鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法,将小鼠分为对照组(Ctrl group)和慢性束缚应激组(CRS group),每组 9 只,对照组和慢性束缚应激组小鼠均饲养于实验动物中心屏障环境中,在每天 9:00 ~ 12:00 将慢性束缚应激组小鼠置于自制行为限制装置中束缚 3 h,持续 14 d。

1.2.2 组织样本采集

实验结束后,小鼠禁食 6 h,称重后用 1%戊巴比妥钠,按照 5 μ L/g 小鼠体重剂量腹腔注射进行麻醉,并断颈处死。解剖后分别采集小鼠十二指肠和结肠组织置于预冷的 PBS 缓冲液中冲洗,用滤纸吸干水分,置于液氮冷冻,转移至 -80 °C 保存,用于后续分子指标的检测。另剪取一小块十二指肠和结肠置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,生理盐水洗涤 3 次,保存于 70%乙醇用于后续的组织切片制作。为减少个体差异,采集的各类组织均选择固定部位。

1.2.3 组织切片及 HE 染色

将固定好的组织进行梯度 75%、85%、90%、95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡与包埋,切片(厚度 5 μ m)、粘片与烘片。并进行苏木素-伊红(HE)染色,镜下观察拍照,用 Image J 软件测量十

二指肠绒毛长度,隐窝深度,并根据评分标准对结肠病理切片进行评分,病理组织学评分见表 1^[31]。

1. 2. 4 RNA 提取及反转录

将约 50 mg 组织加入 1 mL TRIpure 后低温匀浆裂解,加入 200 μ L 氯仿震荡 15 s,室温静置 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min,取上层含 RNA 的水相 500 μ L 加入 500 μ L(等体积)异丙醇,颠倒混匀,并于室温静置 10 min,进行 RNA 沉淀;4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 1 mL 0.1%(v/v)DEPC 水配制的 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,该步骤重复 2 次以提高 RNA 的质量;4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,室温干燥 1 ~ 2 min,DEPC 水溶解 RNA,使用 NanoPhotometer-N50-Touch 分光光度计对 RNA 浓度和质量测定并记录,根据反转录试剂盒说明书的方法,取 2 μ g 总 RNA,在去除基因组 DNA 后,进行逆转录反应得到 cDNA。

1. 2. 5 实时荧光定量聚合酶链式反应分析

实时定量聚合酶链式反应使用 SYBRGreen 染料法,反应体系 12.5 μ L,循环参数包括 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,扩增 40 个循环,应用熔解曲线程序进行连续荧光测量。以 β -actin 为内参基因,使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 进行计算目标基因的相对表达水平,引物序列见表 2。

1. 2. 6 蛋白免疫印迹分析

使用 RIPA buffer 加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂后,提取小鼠十二指肠、结肠总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测得蛋白浓度,每个样本取 30 μ g 总蛋白加入蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸变性后上样,恒压 120 V,电泳 1 h 分离不同分子量蛋白质,恒流 200 mA,湿转 60 min 将 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。封闭液室温封闭 1 h 后,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(β -actin 抗体的稀释比为 1 : 5000,其他抗体稀释比均为 1 : 2000),PBST 洗涤 3 次,每次 6 min,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(抗体稀释比均为 1 : 5000),室温孵育 1.5 h,PBST 洗涤 3 次,每次 6 min,后用 ECL 超敏发光液显影曝光拍照,将得到的目的蛋白条带用 Image J 软件进行光密度分析并统计灰度值。

1. 2. 7 免疫荧光染色

石蜡切片脱蜡,用 EDTA 抗原修复液(pH = 8.0)中火 8 min,停火 8 min,中低火 7 min 进行修复。自然冷却后脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min,3% BSA 封闭 30 min,滴加一抗湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,晃动洗涤 3 次,每次 5 min,滴加二抗,避光室温孵育 50 min,DAPI 避光室温孵育 10 min 复染细胞核,淬灭组织自发荧光。抗荧光淬灭封片剂

表 1 病理组织学评分表
Table 1 Pathohistology score sheet

评分 Score	溃疡/个 Ulcers/ number	上皮细胞变化 Epithelial cell changes	炎性浸润 Inflammatory infiltrate	淋巴结/个 Lymph nodes/ number
0	0	正常 Normal	无 None	0
1	1	杯状细胞缺失 Goblet cells deletion	隐窝周围浸润 Peri-cryptic infiltration	1
2	2	杯状细胞大面积缺失 Large deletion of goblet cells	黏膜肌层出现浸润 Infiltration of the muscular layer of the mucosa	2
3	3	隐窝缺失 Crypt deletion	黏膜肌层普通浸润,黏膜增厚 Generalized infiltration of the muscular layer of the mucosa with thickening of the mucosa	3
4	> 3	隐窝大面积缺失或息肉再生 Large deletion of crypt or polyp regeneration	黏膜下层浸润 Infiltration of submucosal layer	4

表 2 qRT-PCR 引物序列表
Table 2 Sequence list of qRT-PCR primers

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')
β -actin	GGCTGTATTCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-1 β	GCAACTGTTCCTGAACCTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF- α	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
MCP-1	TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
IL-10	AGCCTTATCGGAAATGATCCAGT	GGCCTTGTAGACACCTTGGT

封片,采集图像:DAPI 激发波长 330 ~ 380 nm,发射波长 420 nm;使用 Niko 正置荧光显微镜对结果进行观察和拍照。

1.2.8 免疫组化

将结肠、十二指肠组织石蜡切片充分脱蜡,100%、95%、90%、80%、70%梯度乙醇依次复水,切片浸泡在柠檬酸盐缓冲液中微波加热修复,3%过氧化氢稀释液消除内源性过氧化物酶的活性;羊血清封闭液 37 ℃ 孵育 30 min,一抗 4 ℃ 过夜孵育,PBS 洗涤,滴加二抗 37 ℃ 温箱孵育 30 min;PBS 洗涤,DAB 显色及苏木精复染,脱水后中性树脂封片保存拍照。

1.3 统计学分析

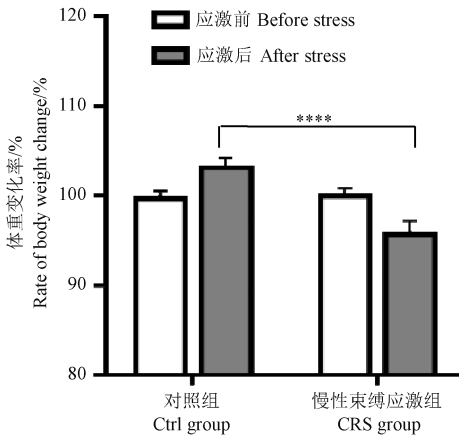
数值用平均值 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,统计分析用 SPSS 26.0 软件进行,组间的比较分析用配对 *t* 检验进行检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。使用 GraphPad Prism 9.0 绘图。

2 结果

2.1 慢性束缚应激对体重及肠道组织病理学变化的影响

与对照组相比,慢性束缚应激显著降低了小鼠体重($P < 0.0001$) (见图 1),这与先前的研究结果

一致^[31-33]。苏木素-伊红 (HE) 染色结果发现,慢性束缚应激小鼠十二指肠绒毛均出现缩短和脱落现象 (图 2A),绒毛高度显著缩短,绒毛高度与隐窝深度比值均显著降低 ($P < 0.0001$) (图 2B ~ 2D);此外,与对照组相比,慢性束缚应激小鼠结肠表现出结肠黏膜炎性细胞浸润、隐窝结构异常的现象,病



注:与对照组相比,**** $P < 0.0001$ 。

图 1 慢性束缚应激对小鼠体重变化的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 9$)

Note. Compared with Ctrl group, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figure)

Figure 1 Effect of chronic restraint stress on body weight changes in mice ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 9$)

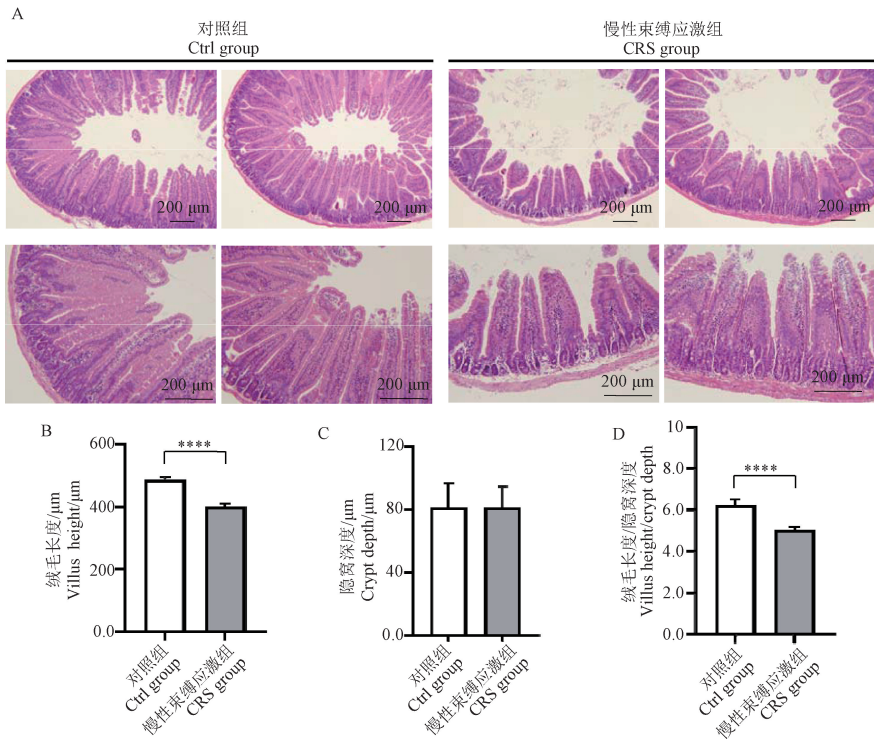


图 2 慢性束缚应激对小鼠十二指肠黏膜形态的影响 (HE 染色, $n = 3$)

Figure 2 Effect of chronic restraint stress on duodenal morphology in mice (HE staining, $n = 3$)

理组织学评分显著升高($P < 0.05$),出现一定程度的病理损伤(图 3)。

2.2 慢性束缚应激对肠道紧密连接蛋白表达的影响

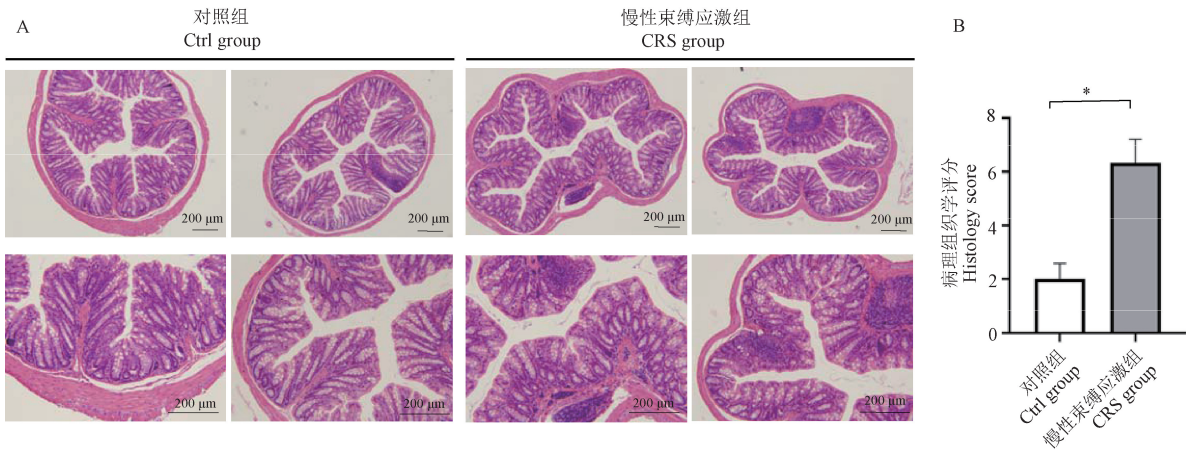
为探究慢性束缚应激对肠道屏障功能的影响,测定了肠道组织代表性紧密连接蛋白的表达。如图 4 所示,慢性束缚应激显著降低小鼠十二指肠紧密连接蛋白 Occludin、Claudin-1 的表达($P < 0.01$)。免疫荧光结果显示,慢性束缚应激能降低十二指肠组织紧密连接蛋白 Occludin 的原位表达(图 5)。如图 6 所示,慢性束缚应激显著降低小鼠结肠紧密连接蛋白 Occludin 的表达($P < 0.05$)。

2.3 慢性束缚应激对肠道组织炎性细胞因子表达的影响

为探究慢性束缚应激对肠道炎症反应的影响,测定了具有代表性的炎性细胞因子和趋化因子。慢性束缚应激显著提高小鼠十二指肠炎性细胞因子和趋化因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $MCP-1$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达($P < 0.05$)(图 7A)。慢性束缚应激显著提高小鼠结肠炎性细胞因子和趋化因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $MCP-1$ mRNA 的表达($P < 0.001$)(图 7B)。

2.4 慢性束缚应激诱导肠上皮细胞的凋亡

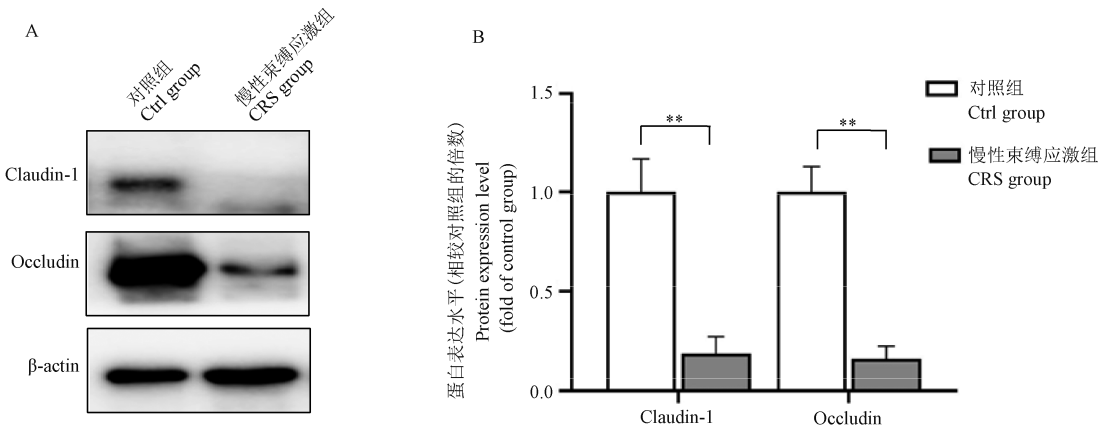
如图 8,为了观察肠上皮细胞凋亡情况,通过免疫组化,观察到慢性束缚应激小鼠十二指肠上皮细



注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)
图 3 慢性束缚应激对小鼠结肠形态的影响(HE 染色, $n = 3$)

Note. Compared with Ctrl group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

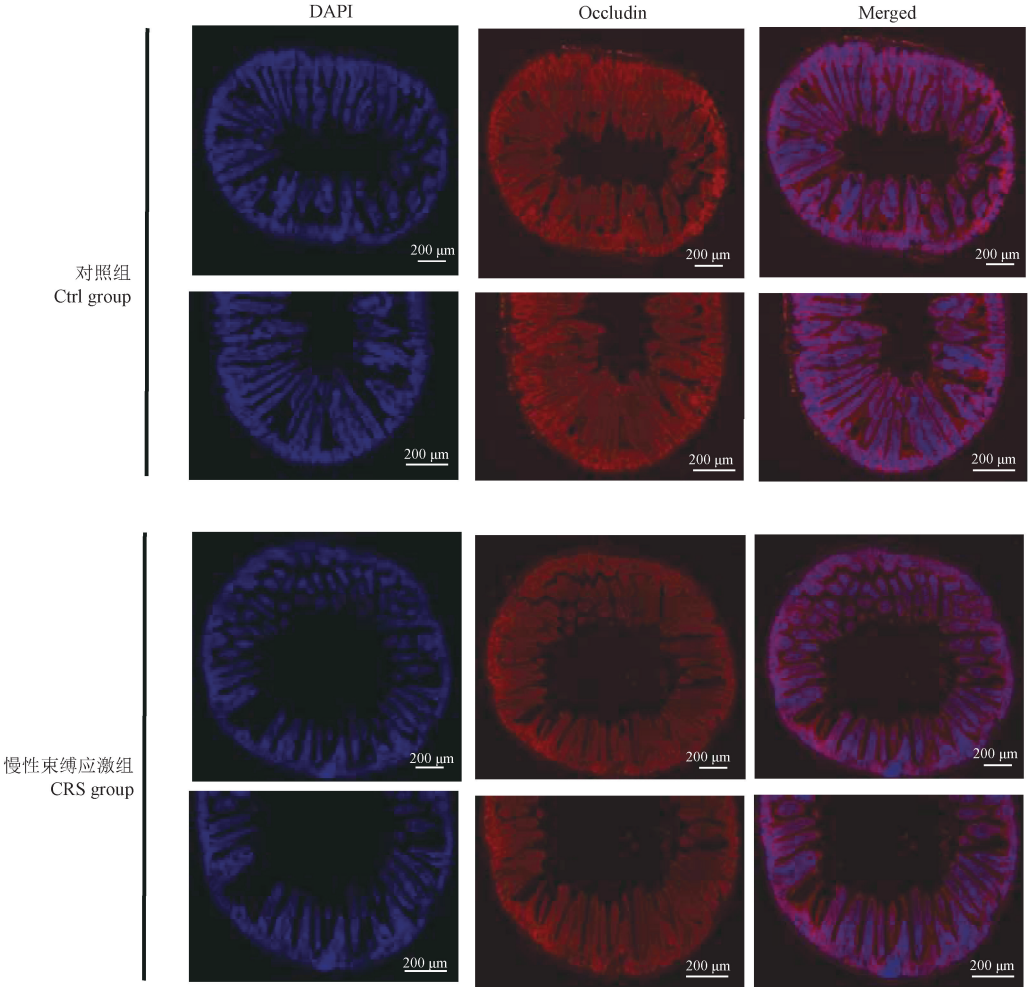
Figure 3 Effect of chronic restraint stress on colonic morphology in mice (HE staining, $n = 3$)



注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。
图 4 慢性束缚应激对小鼠十二指肠紧密连接蛋白表达的影响($n = 4$)

Note. Compared with Ctrl group, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of chronic restraint stress on the expression of duodenal tight junction proteins in mice ($n = 4$)



注:免疫荧光法检测小鼠十二指肠组织紧密连接蛋白 Occludin;DAPI 染出来的细胞核在激发光下为蓝色,阳性表达为 CY3 荧光素标记的红光。

图 5 慢性束缚应激对小鼠十二指肠紧密连接蛋白 Occludin 表达的影响($n = 3$)

Note. Immunofluorescence assay for mouse duodenal tissue tight junction protein Occludin. DAPI-stained nuclei are blue in excitation light and positively expressed as CY3 fluorescein-labeled red.

Figure 5 Expression of duodenum restraint stress on the expression of colonic tight junction protein Occludin in mice ($n = 3$)

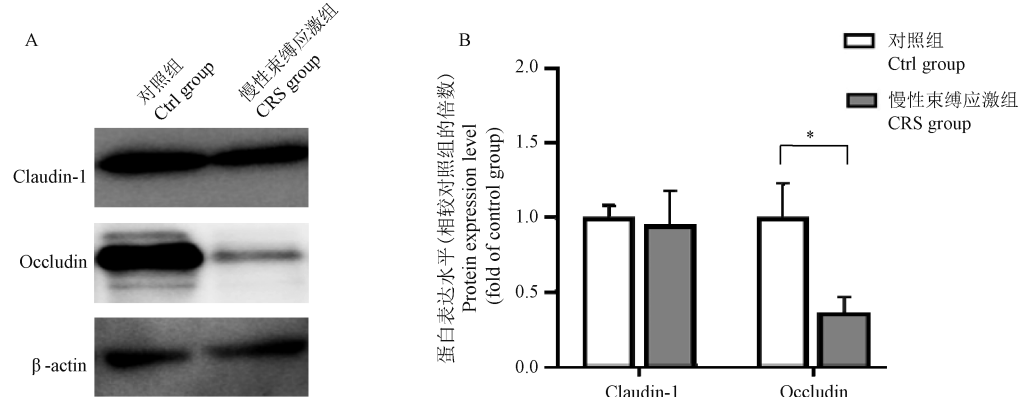
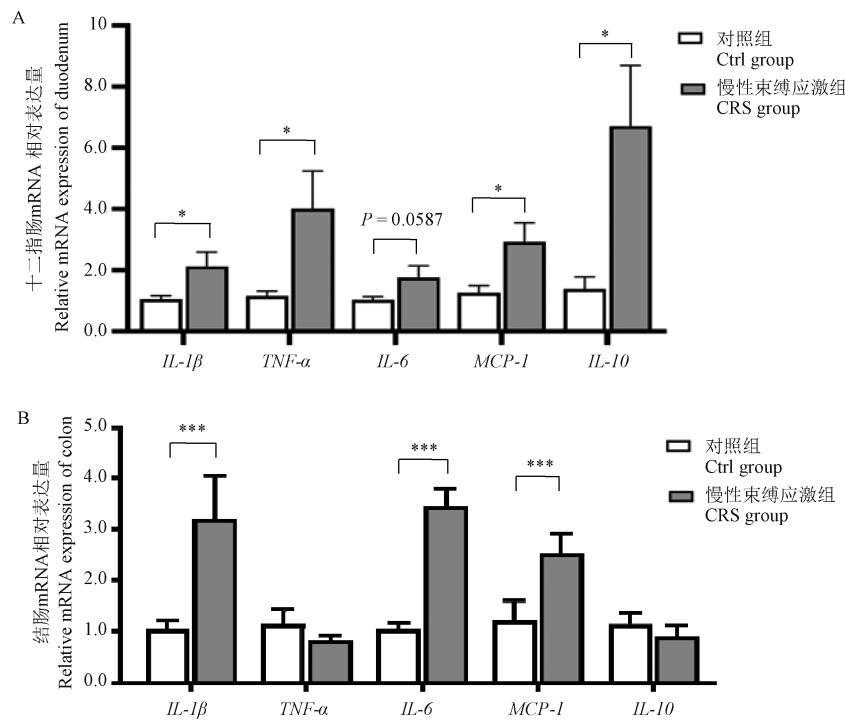


图 6 慢性束缚应激对小鼠结肠紧密连接蛋白表达的影响($n = 4$)

Figure 6 Expression of chronic restraint stress on the expression of colonic tight junction protein in mice ($n = 4$)



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 7 慢性束缚应激对小鼠十二指肠和结肠炎性细胞因子基因表达的影响($n = 6$)

Note. Compared with Ctrl group, *** $P < 0.001$.

Figure 7 Effect of chronic restraint stress on the expression of inflammatory cytokines in the duodenum and colon of mice ($n = 6$)

胞凋亡增加;免疫组化结果显示,慢性束缚应激能够显著增加小鼠十二指肠凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 的表达($P < 0.05$) (图 8A,8B)。慢性束缚应激能够增加小鼠结肠凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 的表达趋势(图 8C,8D)。

3 讨论

本研究结合社会心理应激导致 IBD、IBS 等一系列疾病的特点,模拟社会心理应激环境,建立了 CRS 小鼠肠道应激损伤模型,并观察到该模型小鼠肠组织出现病理损伤,导致肠屏障功能障碍,主要表现为十二指肠绒毛脱落、绒毛高度缩短、绒毛高度/隐窝深度比值降低、肠绒毛受损,以及肠组织紧密连接蛋白的表达水平降低等。CRS 促使肠上皮细胞凋亡相关蛋白增加。此外,通过对 CRS 小鼠肠道炎症水平的监测,发现 CRS 可导致肠道组织炎性细胞因子表达升高,炎性细胞浸润,出现一定程度的炎症反应。

CRS 与多种胃肠道疾病的发病机制有关^[19-20]。有研究表明,社会心理应激改变了大脑和肠道之间的相互作用,并可能加剧一系列疾病,包括 IBD 和

IBS^[30,34]。环境(束缚应激)因素是 IBD 发作的关键触发因素^[30],这种现象所涉及的机制尚未完全阐明。临床和实验研究的证据表明,心理应激对肠道敏感性、蠕动性、分泌和通透性有显著影响^[30,34]。IBS 是一种应激敏感性疾病,同时也是一种慢性疾病,严重降低患者的生活质量和工作效率,据报道,IBS 影响 7% ~ 21% 的普通人群^[34-36]。在大多数患者中,IBS 是一种慢性复发性疾病,其症状可能随时间而变化。一项系统回顾显示,在对临床 IBS 患者的长期随访中,2% ~ 18% 恶化,30% ~ 50% 不变,12% ~ 38% 改善^[36]。在 IBS 的动物模型和患者中,慢性应激会破坏胃肠动力,增加内脏疼痛感知,并损害肠道屏障功能。慢性应激可通过升高血浆糖皮质激素水平,改变肠-脑轴调节,促进促炎细胞因子的产生,从而改变胃肠、认知和情绪通路^[23]。

紧密连接(tight junction, TJ)的存在保证了半透性屏障的功能,TJ 在维持肠道通透性中起关键作用^[24],而 TJ 蛋白是粘膜屏障的重要部分^[37]。本研究结果与猜想的一致,在 CRS 小鼠模型中,小鼠十二指肠和结肠组织均出现紧密连接蛋白 Occludin 的表达显著降低,十二指肠 Claudin-1 的表达显著降

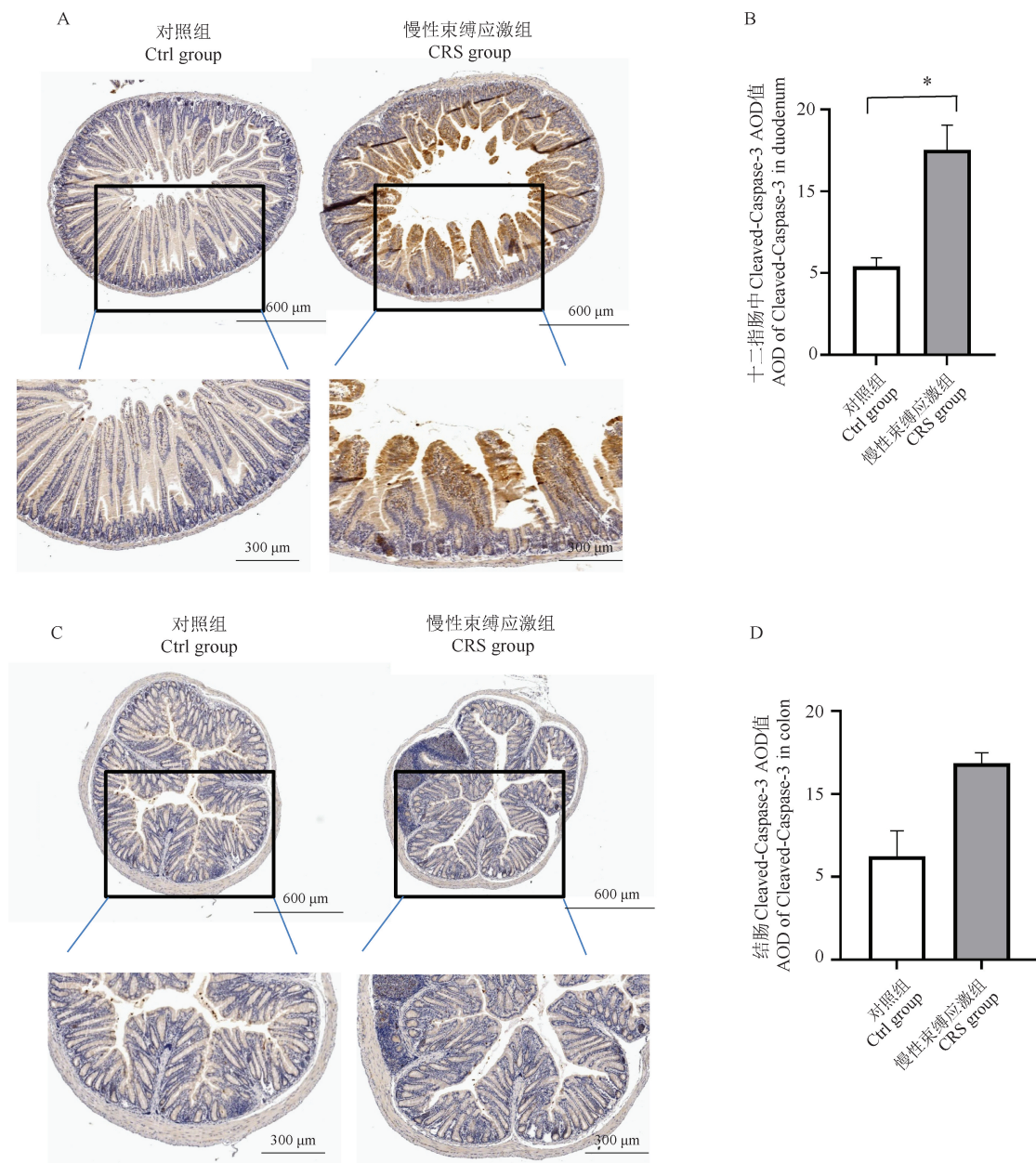


图 8 慢性束缚应激对小鼠十二指肠、结肠促凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达的影响 ($n = 3$)

Figure 8 Effect of chronic restraint stress on the expression of pro-apoptotic protein Cleaved-Caspase-3 in mouse duodenum and colon ($n = 3$)

低。Claudin-1、ZO-1 和 Occludin 是肠组织 TJ 的重要结构蛋白,其表达增加可降低肠通透性并保护肠屏障^[23]。应激可导致肠道屏障功能丧失、肠道通透性增加^[38]。CRS 可以模拟 IBS 患者腹泻症状、内脏超敏反应、肠粘膜屏障通透性降低、免疫调节功能障碍和生态失调的病理状态^[13,23]。本研究中,发现 14 d CRS 也可导致小鼠的肠粘膜以及肠屏障损伤,具体表现为十二指肠绒毛高度变短、隐窝结构异常、绒毛/隐窝比下降;结肠黏膜出现炎性细胞浸润,隐窝结构不规则。此外,肠道是机体营养吸收

的主要场所,肠屏障受损、功能障碍会影响营养物质的消化吸收,伴随身体不适厌食,这可能是小鼠暴露于 CRS 引起体重减轻的原因^[39]。有研究表明,CRS 处理后小鼠的体重减轻以及食物摄入减少^[30,33,40],CRS 和慢性不可预知温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 联合处理 3 周后,小鼠的摄食量明显减少,体重减轻^[41]。在本研究中也发现 CRS 模型小鼠体重出现了显著的降低。

束缚应激可诱导结肠炎动物模型中炎症的发展,对 IBD 啮齿动物模型的研究揭示了应激对肠道

炎症的显著影响^[20]。通过大量的研究发现,应激与肠道炎症和黏膜屏障损伤密切相关^[42]。束缚应激加重实验性结肠炎小鼠中结肠粘膜损伤的程度,慢性应激可驱动原发性肠道炎症,*IL-6* 和 *TNF- α* 显著上调^[36],且有研究表明束缚应激升高血浆 *IL-6* 水平^[43]。此外,慢性应激可通过引发炎症反应中涉及的组分(如 *TNF- α*)的产生而改变紧密连接蛋白表达^[30]。束缚应激使结肠组织中 *IL-1 β* 和 *TNF- α* 水平升高,*IL-5*、*IL-10* 和 *IL-22* 水平降低,暴露于束缚应激的小鼠炎性细胞因子 iNOS、*TNF- α* 和 *IL-1 β* 的表达水平显著增加^[6]。本研究发现,CRS 能够显著提高小鼠十二指肠和结肠炎性细胞因子及炎症标志物基因的表达,研究结果与前期报道一致^[6,30,36,43]。虽然已经证明束缚应激会加重肠道炎症,但其分子机制仍不清楚。有研究表明,氧化应激是 IBD 的病因之一^[10],束缚应激可在大鼠中诱导全身性氧化损伤^[20],慢性应激和高基础水平的应激激素都会导致外周疾病的发展,如肠道炎症^[11,44]。*IL-1 β* 是一种由巨噬细胞分泌的促炎细胞因子,与其他促炎细胞因子(如 *TNF- α* 和 *IL-6*)协同作用,以诱导 IBD 炎症,研究发现,*IL-10* 缺陷小鼠在自发性结肠炎发病前 *IL-1 β* 分泌增加^[45]。慢性束缚应激后基因表达显著上升的 *TNF- α* 是一种重要的促炎因子,*TNF- α* 作为肿瘤坏死因子(TNF)核心家族成员,是肠道上皮细胞增殖和凋亡的主要促炎因子,同时也是 IBD 中重要的调节因子^[30]。严重的炎症反应过程不仅可促使肠道出现较为明显的应激损伤,还会对动物长期的机体性能产生影响。

细胞凋亡可诱导上皮屏障损伤,肠上皮细胞凋亡是引起肠屏障功能障碍和免疫紊乱的重要机制^[46]。细胞凋亡是一种免疫沉默形式的细胞死亡,是抑制肠道进一步炎症的重要过程,且肠上皮细胞易受坏死性凋亡的影响^[47]。束缚应激可通过多种损伤途径损伤肠道,增加氧化应激,加重纤维化,增强炎症,甚至促进细胞凋亡^[11]。*Caspase 3* 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,能被凋亡信号活化,对凋亡相关蛋白进行专一性切割,从而失去抗凋亡活性,转变为促凋亡蛋白^[48-50]。有研究表明,应激诱导的妊娠猪中观察到肠组织中 Cleaved-*Caspase-3* 水平的显著增加,束缚应激后,妊娠猪肠道细胞增殖与凋亡的平衡被打破,束缚应激诱导妊娠猪肠道组织中 *Caspase-3* 表达相应增加,表明细胞凋亡增加损害了妊娠猪的肠粘膜屏障^[1]。高果糖

可加重束缚应激对肠粘膜屏障的损伤,降低肠道消化吸收能力,导致潘氏细胞缺陷,抑制抗菌肽的表达,增加肠道细胞凋亡^[51],氧化损伤诱导和触发细胞凋亡可引起分子损伤^[52]。此外,束缚应激诱导小鼠十二指肠上皮细胞的凋亡性细胞死亡,Cleaved-*Caspase-3* 阳性细胞显著增加^[9]。本研究结果发现,CRS 小鼠模型肠道 Cleaved-*Caspase-3* 的蛋白水平显著增加。以上结果提示,激活凋亡信号通路,促进肠道上皮细胞的凋亡,是 CRS 引起肠道屏障功能障碍的可能原因之一。

CRS 作为一种非损伤性刺激,既能较好地模拟人类产生应激及其导致身心疾病的过程,也能够适应应激状态由急性转入慢性的发展趋势^[53]。已构建的模型中,急性和慢性束缚实验有时间强度和束缚强度不同,时间强度有每天 1、2、3、6 h 等,应激强度的选择有连续 1、3、7、14、21 和 28 d 等^[10,21,30,40-41]。有研究证明,束缚 4 h、1 d 或 4 d 血浆皮质酮水平显著上升,炎症因子及紧密连接蛋白未见显著性差异^[27-28],而长时间束缚应激导致胃肠破坏和肠粘膜通透性增加^[10,21,29]。此外,研究表明长期束缚应激(> 14 d)多数用于构建 MDD 相关动物模型^[8,38,41,54],且长期 CRS 后机体产生了适应机制^[15,55],而多数研究的 CRS 模型缺少评价或肠道损伤的评价指标单一,聚焦于肠损伤的研究较少,且缺乏合适的动物模型一直是研究肠道疾病损伤机制的障碍。因此,需要一种应激强度足够、肠应激损伤明显的动物模型。构建小鼠慢性束缚肠应激损伤动物模型,通过一系列指标的检测,结果显示,CRS 可导致应激小鼠肠道组织结构异常、肠屏障功能障碍、肠上皮细胞凋亡,引发肠道炎症反应,提示 CRS 肠道损伤小鼠模型构建成功,但具体致病机制有待进一步深入揭示。

参 考 文 献(References)

- [1] XU W, LU J, CHEN Y, et al. Impairment of CRH in the intestinal mucosal epithelial barrier of pregnant *Bama* miniature pig induced by restraint stress [J]. *Endocr J*, 2021, 68(4): 485-502.
- [2] MOLINA-TORRES G, RODRIGUEZ-ARRASTIA M, ROMAN P, et al. Stress and the gut microbiota-brain axis [J]. *Behav Pharmacol*, 2019, 30(2-3): 187-200.
- [3] FISCHER I C, SHANAHAN M L, HIRSH A T, et al. The relationship between meaning in life and post-traumatic stress symptoms in US military personnel: a meta-analysis [J]. *J Affect Disord*, 2020, 277: 658-670.
- [4] PEREIRA A. Combat trauma and the diagnosis of post-traumatic

- stress disorder in female and male veterans [J]. *Mil Med*, 2002, 167(1): 23-27.
- [5] 夏峰, 冯正直. 军事应激研究进展与类战争身心应激模型建立的思考 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(24): 2335-2340.
- XIA F, FENG Z Z. Progress of military stress and thinking on establishment of a model of combat-like psychosomatic stress [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2017, 39(24): 2335-2340.
- [6] LIN R, WANG Z, CAO J, et al. Role of melatonin in murine "restraint stress"-induced dysfunction of colonic microbiota [J]. *J Microbiol*, 2021, 59(5): 500-512.
- [7] LU J, XU X, HUANG Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2021, 8(11): 981-990.
- [8] LI C C, YE F, XU C X, et al. Effect of *Radix Polygalae* extract on the colonic dysfunction in rats induced by chronic restraint stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 294: 115349.
- [9] CHUANG D J, PETHAPERUMAL S, SIWAKOTI B, et al. Activating transcription factor 3 protects against restraint stress-induced gastrointestinal injury in mice [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3530.
- [10] KOH S J, KIM J W, KIM B G, et al. Restraint stress induces and exacerbates intestinal inflammation in interleukin-10 deficient mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28): 8580-8587.
- [11] WANG T, GAO L, YANG Z, et al. Restraint stress in hypertensive rats activates the intestinal macrophages and reduces intestinal barrier accompanied by intestinal flora dysbiosis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1085-1110.
- [12] WILLIAMS C L, VILLAR R G, PETERSON J M, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94(3): 611-621.
- [13] CHEN Q, ZHANG H, SUN C Y, et al. Evaluation of two laboratory model methods for diarrheal irritable bowel syndrome [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 5.
- [14] KUGE T, GREENWOOD-VAN MEERVELD B, SOKABE M. Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: reversal by wood creosote [J]. *Life Sci*, 2006, 79(9): 913-918.
- [15] MASERE C, NAKADE Y, ZHENG J, et al. Chronic restraint stress has no more stimulatory effects on colonic motility in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 453(3): 147-150.
- [16] 冯文林, 伍海涛, 洪睦铿, 等. 中国国内肠易激综合征流行病学调查研究的现状 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(8): 685-687, 691.
- FENG W L, WU H T, HONG M K, et al. Current status of the epidemiological investigation of irritable bowel syndrome in China [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2017, 41(8): 685-687, 691.
- [17] 李晓青, 常敏, 许东, 等. 中国肠易激综合征流行病学调查现状分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(8): 734-739.
- LI X Q, CHANG M, XU D, et al. The current status of the epidemiological study of irritable bowel syndrome in China [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 22(8): 734-739.
- [18] 李彦楠, 杨丽旋, 赵钟辉, 等. 《2020 年中国肠易激综合征专家共识意见》解读 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(10): 1151-1155.
- LI Y N, YANG L X, ZHAO Z H, et al. Interpretation of expert consensus on irritable bowel syndrome in China in 2020 [J]. *Chin J Clin*, 2021, 49(10): 1151-1155.
- [19] BHATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 329-354.
- [20] ISRAELI E, HERSHCIOVICI T, BERENSHTEIN E, et al. The effect of restraint stress on the normal colon and on intestinal inflammation in a model of experimental colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(1): 88-94.
- [21] ZHANG Y, W U S, LIU Y, et al. Acute cold water-immersion restraint stress induces intestinal injury and reduces the diversity of gut microbiota in mice [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 706849.
- [22] PENG Z, PENG S, LIN K, et al. Chronic stress-induced depression requires the recruitment of peripheral Th17 cells into the brain [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 186.
- [23] ZHANG Z, SHAO S, ZHANG Y, et al. Xiaoyaosan slows cancer progression and ameliorates gut dysbiosis in mice with chronic restraint stress and colorectal cancer xenografts [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 132: 110916.
- [24] SCUDERI S A, CASILI G, LANZA M, et al. Efficacy of a product containing xyloglucan and pea protein on intestinal barrier function in a partial restraint stress animal model [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2269.
- [25] WU W, SUN M, ZHANG H P, et al. Prolactin mediates psychological stress-induced dysfunction of regulatory T cells to facilitate intestinal inflammation [J]. *Gut*, 2014, 63(12): 1883-1892.
- [26] 马如飞. 束缚应激加重挤压伤大鼠肠道损伤及内质网应激蛋白的表达变化 [D]. 石家庄: 河北医科大学; 2016.
- MA R F. Restraint stress aggravates intestinal injury and changes of endoplasmic reticulum stress protein expression in rats with crush injury [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University; 2016.
- [27] LANGLOIS L D, ODDOUX S, AUBLÉ K, et al. Effects of glutamine, curcumin and fish bioactive peptides alone or in combination on intestinal permeability in a chronic-restraint stress model [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7220.
- [28] LEE C Y. Chronic restraint stress induces intestinal inflammation and alters the expression of hexose and lipid transporters [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(6): 385-391.
- [29] ZHAO Y, WANG C, YANG T, et al. Chlorogenic acid alleviates chronic stress-induced intestinal damage by inhibiting the

- P38MAPK/NF- κ B pathway [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71 (24): 9381–9390.
- [30] LI C C, GAN L, TAN Y, et al. Chronic restraint stress induced changes in colonic homeostasis-related indexes and tryptophan-kynurenine metabolism in rats [J]. J Proteomics, 2021, 240: 104190.
- [31] KHAN S, WALIULLAH S, GODFREY V, et al. Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(567): eaay6218.
- [32] YU J, LIU T, GUO Q, et al. Disruption of the intestinal mucosal barrier induced by high fructose and restraint stress is regulated by the intestinal microbiota and microbiota metabolites [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(2): e0469822.
- [33] CHIBA S, NUMAKAWA T, NINOMIYA M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 39(1): 112–119.
- [34] QIN H Y, CHENG C W, TANG X D, et al. Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14126–14131.
- [35] SEBASTIÁN DOMINGO J J. Síndrome del intestino irritable [J]. Med Clin (Barc), 2022, 158(2): 76–81.
- [36] CHEY W D, KURLANDER J, ESWARAN S. Irritable bowel syndrome: a clinical review [J]. JAMA, 2015, 313(9): 949–958.
- [37] XU X, HU H, ZENG H, et al. Sinisan ameliorates colonic injury induced by water immersion restraint stress by enhancing intestinal barrier function and the gut microbiota structure [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 598–609.
- [38] LIU Q F, KIM H M, LIM S, et al. Effect of probiotic administration on gut microbiota and depressive behaviors in mice [J]. Daru, 2020, 28(1): 181–189.
- [39] ZHANG W, JIAO L, LIU R, et al. The effect of exposure to high altitude and low oxygen on intestinal microbial communities in mice [J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0203701.
- [40] DENG Y, ZHOU M, WANG J, et al. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: disturbances of the kynurenine metabolic pathway in both the gut and brain [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1–16.
- [41] QIAO Y, ZHAO J, LI C, et al. Effect of combined chronic predictable and unpredictable stress on depression-like symptoms in mice [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(15): 942.
- [42] BILTZ R G, SAWICKI C M, SHERIDAN J F, et al. The neuroimmunology of social-stress-induced sensitization [J]. Nat Immunol, 2022, 23(11): 1527–1535.
- [43] NUKINA H, SUDO N, AIBA Y, et al. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice [J]. J Neuroimmunol, 2001, 115(1/2): 46–52.
- [44] MEENA A S, SHUKLA P K, RAO R, et al. TRPV6 deficiency attenuates stress and corticosterone-mediated exacerbation of alcohol-induced gut barrier dysfunction and systemic inflammation [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1093584.
- [45] LU Q, YANG M F, LIANG Y J, et al. Immunology of inflammatory bowel disease: molecular mechanisms and therapeutics [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 1825–1844.
- [46] LIU L, LIANG L, YANG C, et al. Extracellular vesicles of *Fusobacterium nucleatum* compromise intestinal barrier through targeting RIPK1-mediated cell death pathway [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1–20.
- [47] PATANKAR J V, BECKER C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(9): 543–556.
- [48] MCKENNA Z J, FENNEL Z J, BERKEMEIER Q N, et al. Exercise in hypobaric hypoxia increases markers of intestinal injury and symptoms of gastrointestinal distress [J]. Exp Physiol, 2022, 107(4): 326–336.
- [49] CHENG E H, KIRSCH D G, CLEM R J, et al. Conversion of Bcl-2 to a bax-like death effector by caspases [J]. Science, 1997, 278(5345): 1966–1968.
- [50] MCKENNA Z J, BELLOVARY B N, DUCHARME J B, et al. Circulating markers of intestinal barrier injury and inflammation following exertion in hypobaric hypoxia [J]. Eur J Sport Sci, 2023, 23(10): 2002–2010.
- [51] YU J, LIU T, GAO Z, et al. *Akkermansia muciniphila* colonization alleviating high fructose and restraint stress-induced jejunal mucosal barrier disruption [J]. Nutrients, 2022, 14 (15): 3164.
- [52] MAZZON E, CUZZOCREA S. Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294 (5): G1268-G1280.
- [53] WANG B, CHEN D, JIANG R, et al. TIP60 buffers acute stress response and depressive behaviour by controlling PPAR γ -mediated transcription [J]. Brain Behav Immun, 2022, 101: 410–422.
- [54] LI J, LI Y, DUAN W, et al. Shugan granule contributes to the improvement of depression-like behaviors in chronic restraint stress-stimulated rats by altering gut microbiota [J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(9): 1409–1424.
- [55] UEYAMA T, SAIKA M, KOREEDA C, et al. Water immersion-restraint stress induces expression of immediate-early genes in gastrointestinal tract of rats [J]. Am J Physiol, 1998, 275(2): G287-G295.