

CD-1 小鼠孕晚期暴露 LPS 对中老年期焦虑和探索行为的影响

厉雪艳, 陈贵海*

(安徽医科大学第一附属医院神经内科, 合肥 230022)

摘要: 检测 CD-1 小鼠孕晚期暴露细菌脂多糖 (LPS) 对其中老年期焦虑和自发性探索活性行为的影响。结果显示, 15 月龄 CD-1 小鼠在 3 个任务中的焦虑水平较青年组升高, 自发性探索活动降低 ($P_s < 0.05$)。接受 LPS 处理的 15 月龄小鼠与同龄对照组比较, 高 ($50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和低 ($25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 剂量组在旷场中的周边时间均显著长, 跨格子数显著少 ($P_s < 0.05$), 高剂量组的直立次数也减少 ($P < 0.05$)。在黑白巷中, 高剂量组的潜伏期和黑巷时间均显著长于同龄对照组 ($P_s < 0.05$)。高剂量组在高架十字迷宫中的直立次数显著少于同龄对照组。上述结果提示 CD-1 小鼠孕晚期暴露 LPS 可剂量依赖地加速其中老年期任务特异性焦虑和自发性探索活动行为改变。

关键词: 衰老; 妊娠; 细菌脂多糖; 焦虑; 自发性探索活动

中图分类号: R339.38; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0192-04

Effects of lipopolysaccharide exposure during the late pregnancy on anxiety and locomotor behaviors of the middle-aged CD-1 female mice

LI Xueyan, CHEN Guihai

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract: The aim of the present study was to determine whether system inflammation during the late gestation period affects anxiety and locomotor behaviors of the middle-aged female CD-1 mice. At day 15 to 17 in the gestation period, the experimental mice received daily intraperitoneal injection of normal saline (NS), $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS (high dose, HD), or $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS (lower dose, LD). An anxiety-based test battery was completed at the age of 15 months with three behavioral tasks including open field, black-white alley, and elevated plus maze. A group of 5-month old mice was the young control. Results showed that the NS group showed the increased anxiety and decreased locomotor activity compared to the young control as measured by the three tasks ($P_s < 0.05$). The HD group had significantly more peripheral time and fewer squares crossed and rears than the NS group in the open field ($P_s < 0.05$). The LD group also had fewer squares crossed and rears than the control ($P_s < 0.05$). In the black-white alley, the HD group had a significantly increased latency and time in the black alley than the NS group ($P_s < 0.05$). The HD group had fewer rears than the NS group in the elevated plus maze ($P < 0.05$). The results suggested that exposure to lipopolysaccharide during pregnancy could induce a dose-dependent deterioration of an anxiety increase and locomotor decline in the middle-aged female CD-1 mice.

Key words: aging; anxiety; lipopolysaccharide; locomotor; pregnancy

妊娠期母体各系统、器官、免疫状态及内分泌都发生改变, 导致其对各种不良因素尤其是感染者炎症极其敏感^[1]。细菌脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌及其他微生物细胞壁上的特有结构, 可模拟感染后的炎症状态。妊娠期暴露 LPS 会导致动物出现广泛而持久的炎症反应^[2-3], 某些关键炎症因子可通

过血脑屏障损害中枢系统, 导致神经行为学改变^[4]。现有研究表明, 孕期暴露不良因素会显著影响成年子代学习记忆能力、焦虑水平, 或加速子代衰老进程^[5-6]。但是, 目前尚未见孕期暴露不良因素是否会持续影响母亲本身行为的报告。旷场、高架十字迷宫和黑白巷是 3 个常用于衰老小鼠焦虑性检测的任

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 国家青年自然科学基金 (81301094) 和国家自然科学基金 (81370444) 共同资助。

作者简介: 厉雪艳, 硕士研究生。

* 通信作者: 陈贵海, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: doctorcgh@163.com

务, 旷场实验还能测定小鼠的探索行为和自发运动活性^[7]。本研究旨在利用旷场、黑白巷和高架十字迷宫任务探讨孕晚期暴露 LPS 后是否会对 CD-1 小鼠中老期焦虑和自发性探索行为产生影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7~8 周龄清洁级 CD-1 小鼠购于北京维通利华实验动物公司。其中雄鼠 40 只 (30~32 g·只⁻¹), 雌鼠 80 只 (26~28 g·只⁻¹)。实验前适应性喂养 2 周, 饲养于普通环境, 保持明暗周期为 12 h (8:00 开灯), 温度 23℃±1℃, 湿度 55%±5%。交配时, 按 1:2 (雄:雌) 于 21:00 合笼, 次日 7:00 检查阴栓, 查到阴栓者定为受孕第 0 天 (G0)。80 只雌鼠中 30 只雌鼠于第 2 天查到阴栓, 将此 35 只受孕鼠单笼饲养并随机分为 LPS 高剂量组 (12 只), LPS 低剂量组 (12 只), 对照组 (11 只)。LPS 组小鼠于孕 15~17 d 每天经腹腔注射 LPS (Sigma 公司) 50 μg·kg⁻¹·d⁻¹ (高剂量组) 或 25 μg·kg⁻¹·d⁻¹ (低剂量组)。对照组小鼠同期经腹腔注射等容积生理盐水。妊娠结束后继续喂养, 自由饮食, 至 15 月龄开始行为学任务检测。最终各组小鼠数量分别为对照组 10 只、高剂量组 10 只和低剂量组 10 只。同时以 10 只 6 月龄雌鼠 (青年组) 进行相同行为学检测。

1.2 行为学检测

1.2.1 旷场任务 实验装置为一开口的黑色木盒, 内部场地大小 81cm×81cm, 围墙高 28 cm。盒底漆成纵横各 3 条白线 (宽 3 mm), 形成 16 个等大的方格 (每格 20 cm×20 cm)。场地中央放一彩色饮料瓶以激发小鼠好奇心。40 W 白炽灯悬于装置中央高约 2.8 m 处以照明, 每只小鼠接受 1 次测试。小鼠面朝墙自 4 个拐角方格之一放入, 自由探索 5 min。记录潜伏期 (离开放置方格前的时间)、跨线条总数、周边时间 (周边 12 个方格总时间) 及直立次数。每只小鼠测试结束后, 清水清洗场地并擦干。

1.2.2 黑白巷 白铁皮制成 120 cm×9 cm×30 cm 的盒子内壁一半漆成白色, 另一半漆成黑色。每个小鼠背对着白端放入黑端至 90 s 结束, 记录潜伏期 (小鼠第一次从黑端进入白端的时间) 和在黑端停留总时间。

1.2.3 高架十字迷宫 2 个无墙臂 (29 cm×5 cm) 和 2 个敞顶臂 (29 cm×5 cm×15 cm) 形成十字迷宫 (中间形成 5 cm×5 cm 公共区, 臂的底面和围墙壁均为灰色), 由一支架自底部撑起离地 120 cm。将小鼠面朝开放臂放入迷宫公共区, 记录 360 s 内

进入开放臂的次数和呆在开放臂的总时间及站立次数。

1.3 统计学处理

如果资料呈正态分布, 结果用均数±用标准差表示。两组独立样本采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析 (组间比较采用 Bonferroni 检验)。如果资料呈非正态分布, 结果用中位数 (4 分位数间距) 表示, 两组独立样本比较采用 Mann-Whitney U 检验, 多组比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。检验水准设定为 $\alpha=0.05$ 。所有分析由 SPSS 16.0 for Windows 分析软件完成。

2 结果与分析

2.1 旷场任务

对照组潜伏期 ($Z = -2.937, P < 0.001$) 和周边时间 ($F_{(1,18)} = 6.537, P < 0.001$) 显著大于青年组, 跨格子数 [$F_{(1,18)} = 3.272, P = 0.006$] 和直立次数 [$F_{(1,18)} = 1.595; P < 0.001$] 均显著少于青年组。LPS 处理对旷场周边时间 [$F_{(2,27)} = 4.300, P = 0.024$]、跨格子数 ($F_{(2,27)} = 3.912, P = 0.032$) 和直立次数 ($F_{(2,27)} = 5.740, P = 0.008$) 有显著影响, 但对潜伏期无显著影响 ($H = 3.746, P = 0.154$)。两两比较显示高剂量组周边时间显著长于对照组 ($P = 0.007$), 高低剂量组跨格子数 ($P = 0.013, P = 0.048$) 与直立次数 ($P = 0.008, P = 0.035$) 均显著少于对照组。

2.2 黑白巷

对照组潜伏期及黑巷时间显著长于青年组 ($Z = -3.301, P = 0.001; F_{(2,18)} = 2.518; P = 0.002$)。LPS 处理对潜伏期和黑巷时间有显著影响 ($H = 6.883, P = 0.032; F_{(2,27)} = 3.695, P = 0.038$), 即高剂量组潜伏期和黑巷时间均长于对照组 ($P < 0.001, P = 0.012$)。

2.3 高架十字迷宫

与青年组比较, 对照组潜伏期显著延长 ($Z = -3.129, P = 0.002$), 进入开放臂次数 ($Z = -2.321, P = 0.020$) 和直立次数 ($F_{(2,18)} = 0.565; P = 0.031$) 均显著减少。LPS 处理仅对进入站立次数有显著影响 [$F_{(3,27)} = 4.802; P = 0.016$], 即高剂量组显著少于对照组 ($P = 0.012$)。

3 讨论

随着年龄增加人类和啮齿类动物常见焦虑水平改变^[8-9], 这种改变不仅会导致人类社会功能严重受损出现社交孤立、治疗依从性下降等, 更有可能使认知能力受到影响^[10]。本研究发现 15 月龄 CD-1 小

鼠已显示出显著的焦虑性增加,主要表现在旷场中的潜伏期和周边时间增加,在高架十字迷宫中的潜伏期增加及进入开放臂次数减少,黑白巷中的黑巷时间显著增加。已往研究表明年龄相关性焦虑性改变可能具有任务、品系和性别间的差异。例如,老年昆明小鼠在旷场中的焦虑水平升高^[8],而老年雄性 SAMP8 鼠在旷场试验中无显著性改变,但在高

架十字迷宫中焦虑水平增加^[11]。Wistar 大鼠在十字迷宫中的焦虑性随年龄而增加^[12],而 NMRI 小鼠不因衰老而改变^[13]。本研究还发现中老年 CD-1 小鼠的自发探索活性和新奇性降低,表现为旷场跨格子数减少,旷场和高架十字迷宫中的直立次数减少,与既往研究一致^[8]。

表 1 CD-1 小鼠行为学结果

Table 1 Performance of CD-1 mice in the behavioral tasks

任务 Task	指标 Measure	高剂量组 High-dose group	低剂量组 Low-dose group	对照组 Control group	青年组 Young group
旷场 Open filed	潜伏期/s Latency	11.0 (6.0/17.0)	12.5 (8.5/18.7)	6.5 (4.0/11.5)*	3.5 (2.0/4.0)
	周边时间/s Peripheral time	289.9 ± 11.49 [#]	282.4 ± 11.11	272.8 ± 16.02*	228.6 ± 27.84
	跨格子数 Squares crossed	68.6 ± 30.43 [#]	76.9 ± 28.01 [#]	106.1 ± 35.55*	146.5 ± 19.75
黑白巷 Black-white alley	直立次数 Rears	16.3 ± 7.07 [#]	20 ± 7.80 [#]	27.4 ± 7.48*	52.3 ± 10.46
	潜伏期/s Latency	19.5(16.7/21.7) [#]	14.5(11.5/20.0)	12.5(10.5/14.5)*	7.5(6.0/9.2)
十字迷宫 Elevated plus maze	黑巷时间/s Time spent on the black alley	64.8 ± 9.12 [#]	56.7 ± 10.11	52.2 ± 12.06*	35.0 ± 7.74
	潜伏期(s) Latency	10.5 (6.5/12.2)	8.0 (3.7/12.2)	10.0 (3.7/13.2)*	2.0 (1.7/4.2)
十字迷宫 Elevated plus maze	开放臂次数 Entries into open arms	1.0 (0.0/2.0)	1.0 (0.8/2.0)	1.0 (0.0/1.5)*	2.5 (1.0/3.0)
	开放臂时间/s Time spent on the open arms	10.0 (0.0/28.5)	12.50 (5.3/29.3)	12.5 (0.0/28.7)	29 (13.0/48.3)
	直立次数 Rears	3.2 ± 1.9 [#]	5.0 ± 2.7	6.9 ± 3.1*	10.0 ± 2.7

注:与青年组比较 Compared to the young controls: * $P < 0.05$; 与对照组比较 Compared to the blank controls: [#] $P < 0.05$.

妊娠期母体对各种不良因素尤其是对感染或者炎症极其敏感^[1],而孕妇易发生感冒、肠炎、鼻炎、牙周炎等感染性疾病。这些都可导致机体的系统性炎症反应。已有研究表明,大鼠妊娠期暴露 LPS 可对母体产生近期不利影响,包括高血压、蛋白尿和全身广泛炎症反应^[3-4],也可导致子代焦虑性升高,且随年龄增加而愈加明显^[14],但孕期暴露 LPS 是否会对母鼠行为造成持续影响尚未见报道。本研究表明孕晚期暴露 LPS 的高剂量 CD-1 小鼠在旷场和黑白巷中的焦虑性显著升高,且高低剂量组在旷场中的跨格子数和直立次数均显著减少。在高架十字迷宫中,高剂量组的直立次数也显著低于对照组。这些结果表明孕晚期暴露 LPS 可对母鼠行为产生持续性影响,即加重年龄相关性焦虑性增加和自发性探索活性降低,尤其在较高剂量时。

暴露 LPS 后产生炎症反应引起急性病理性行为的机制可能与炎症因子促进了脑内去甲肾上腺素和 5-羟色胺的释放,并激活下丘脑-垂体-肾上腺轴有关^[15-16],但孕晚期 LPS 暴露后对中老年期母鼠神经行为的影响机制尚不清楚。现有研究表明动物和人类暴露于不良因素后可引起对健康持久影响并出现

隔代遗传现象可能与基因组表观修饰改变有关^[17]。CD-1 小鼠于孕期暴露 LPS 后对中老年期神经行为的影响是否涉及表观遗传改变需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Renaud S J, Cotechini T, Quirt J S, et al. Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion[J]. *J Immunol*, 2011, 186: 1799-1808.
- [2] Faas M M, Schuiling G A, Baller J F W, et al. Glomerular inflammation in pregnant rats after infusion of low dose endotoxin: an immunohistological study in experimental pre-eclampsia[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147: 1510-1518.
- [3] Faas M M, Moes H, van der Schaaf G, et al. Total white blood cell counts and LPS-induced TNF alpha production by monocytes of pregnant, pseudopregnant and cyclic rats[J]. *J Reprod Immunol*, 2003, 59: 39-52.
- [4] Lerner A J, Hedera P, Koss E, et al. Delirium in Alzheimer disease[J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1997, 11: 16-20.
- [5] Tomi M, Zhao Y, Thamotharan S, et al. Early life nutrient restriction impairs blood-brain metabolic profile and neurobehavior predisposing to Alzheimer's disease with aging[J]. *Brain Res*, 2013, 1495: 61-75.
- [6] Chen G H, Wang H, Yang Q G, et al. Acceleration of age-related learning and memory decline in middle-aged CD-1 mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy[J]. *Behav Brain Res*, 2011, 218:

- 267-279.
- [7] 王芳, 陈贵海. 中年 C57BL/6 小鼠焦虑行为改变[J]. 安徽农业大学学报, 2008, 35(4): 507-511.
- [8] Chen G H, Wang Y J, Zhang L Q, et al. Age- and sex-related disturbance in a battery of sensorimotor and cognitive tasks in Kunming mice[J]. *Physiol Behav*, 2004, 83(3): 531-541.
- [9] Comijs H C, Deeg D J, Dik M G, et al. Memory complaints; the association with psycho-affective and health problems and the role of personality characteristics. A 6-year follow-up study[J]. *J Affect Disord*, 2002, 72: 157-165.
- [10] Scrabble H, Burns-Cusato M, Medrano S. Anxiety and the aging brain: stressed out over p53?[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(12): 1587-1591.
- [11] Chen G H, Wang C, Yang cheng H Y, et al. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8[J]. *Physiol Behav*, 2007, 91(5): 644-651.
- [12] Boguszewski P, Zagrodzka J. Emotional changes related to age in rats-a behavioral analysis[J]. *Behav Brain Res*, 2002, 133: 323-332.
- [13] Lamberty Y, Gower A J. Spatial processing and emotionality in aged NMRI mice: a multivariate analysis[J]. *Physiol Behav*, 1993, 54: 339-343.
- [14] Enayati M, Solati J, Hosseini M H, et al. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 87: 295-302.
- [15] Dunn A J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone[J]. *Life Sci*, 1988, 43(5): 429-435.
- [16] Dunn A J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry[J]. *Clin Neurosci Res*, 2006, 6(1/2): 52-68.
- [17] Collotta M, Bertazzi P A, Bollati V. Epigenetics and pesticides[J]. *Toxicology*, 2013, 307: 35-41.