

青年期心理社会环境改变对中老年小鼠焦虑和自发探索活性的影响

李学伟¹, 刘星靓², 邓湘红², 杨启纲³, 王芳³, 曹磊³, 陈贵海^{4*}

- (1. 南华大学附属第一医院神经内科, 衡阳 421001; 2. 南华大学附属郴州医院神经内科, 郴州 423000;
3. 安徽医科大学第一附属医院神经内科, 合肥 230022; 4. 安徽医科大学附属巢湖医院神经内科和全科医学科, 合肥 230601)

摘要: 探索青年期心理社会环境改变对中老年 CD-1 小鼠焦虑和自发探索活性行为的影响。结果表明, 与青年组 (3 月龄) 比较, 老年对照组 (18 月龄) 在旷场潜伏期和周边时间显著延长, 跨格子数显著减少 ($P_s < 0.05$); 在黑白巷黑端时间和潜伏期显著延长, 黑端到白端次数显著减少 ($P_s < 0.05$)。12 月龄应激组在旷场周边时间和在黑白巷黑端时间显著长于丰富环境组和对照组, 跨越格子数显著减少 ($P_s < 0.05$)。18 月龄应激组在旷场周边时间和在黑白巷黑端时间、潜伏期显著长于丰富环境组 ($P_s < 0.05$)。这些提示 CD-1 小鼠焦虑行为改变具有年龄依赖性, 青年期心理社会环境改变可调节小鼠年龄相关性焦虑和自发探索活性行为的改变。

关键词: 衰老; 焦虑; 丰富环境; 探索活性; 应激

中图分类号: S865.13; R749.72

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)06-0871-04

Effect of psychosocial environment change on anxiety and locomotor behaviors of the middle-aged CD-1 mice

LI Xuewei¹, LIU Xingliang², DENG Xianghong², YANG Qigang³, WANG Fang³, CAO Lei³, CHEN Guihai⁴

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001;

2. Department of Neurology, the First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000;

3. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

4. Department of Neurology and General Practice, the Affiliated Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract: The aim of the present study was to investigate whether adolescent psychosocial environment affects anxiety and locomotor behaviors in the middle-aged CD-1 mice. The latency and peripheral time significantly increased, and the number of squares crossed in the open field significantly decreased ($P_s < 0.05$) in the 18 months old control mice (old) than those in the 3 months old control mice (young). In the black-white alley task, the old control group also had a significantly longer latency and time spent in the black alley, and a lower number from the black to white alley than the young control group ($P_s < 0.05$). At 12 months old, the stressed group had a significantly increased time spent in the black alley of black-white alley and peripheral time in the open-field than the control group and enriched-environment group ($P_s < 0.05$), but the stressed group had a decreased square crossed number in the open-field ($P_s < 0.05$). At the 18 months old, the stressed group had more peripheral time, latency and time spent in the black alley than the enriched-environment group only ($P_s < 0.05$). The above results suggested that changes of anxious behavior in the CD-1 mice were age-dependent and chronic changes of psychosocial environments during adolescent-youth could modulate the age-related increase of anxiety and decline of locomotor activity in the middle-aged CD-1 mice.

Key words: aging; anxiety; enriched environment; locomotor; stress

收稿日期: 2016-08-17

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

作者简介: 李学伟, 博士。E-mail: lixuewei2003@163.com

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

应激是机体受到应激原刺激后产生一系列神经-内分泌反应,进而引起各种机能和代谢水平改变的过程^[1],可分为适宜和不适宜应激两种。前者有助于学习和记忆,后者则作用相反。研究发现,成年后的许多疾病与生命早期或胎儿期受到的直接或间接环境变化有关,涉及到基因与环境的双重机制^[2],并已概括为“成人疾病胎源”学说^[3]。慢性复合应激是由多种应激原组成,可使动物或人长期接受心理刺激而产生慢性心理应激反应,模拟人类慢性应激状态^[4]。这种状态可对行为产生长期影响。然而,丰富环境(enriched environmental, EE)可以减轻这种应激的长期效应。研究证实,EE可以增加海马体积和大脑皮质厚度、树突分支和树突棘长度、突触的体积和数量等^[5-7]。但是,目前尚未见早期不同心理社会环境干预对中老年期行为改变影响的报告。为此,本研究利用旷场和黑白巷两种检测任务探索早期不同心理社会环境处理 CD-1 小鼠是否对中老年期的焦虑性和自发探索活性行为产生影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

CD-1 小鼠(8周,雌雄各75只)购自于湖南省斯莱克景达实验动物有限公司。饲养温度(22±2)℃,湿度(55±5)%,早晨07:00开灯,晚上19:00关灯。雌、雄小鼠分别以3~4只·笼⁻¹群养,处理方式:①对照组小鼠自由活动进食,未予任何干预。②应激组小鼠自2月龄每天随机抽取下列4种应激方式(束缚、悬吊、夜间光照和夜间禁食)^[8]之一进行应激实验。每周期为4d,共7个周期,之后常规饲养。束缚是将小鼠固定在特定的塑料网布内(35cm×40cm),致其身体活动受限,但呼吸不受影响、不产生强烈反抗性紧张。首次30min,以后每次均延长10min;悬吊是将鼠尾朝上悬挂,并固定于离地1.2m高的横杆上,首次悬挂30min,以后每次延长10min。夜间光照在19:00到7:00的时间段内,每隔30min光照1次,每次持续30min。夜间禁食是自19:00到7:00时间段移去笼内食物(更换垫料,防止有食物遗漏在笼内),小鼠自由饮水。③EE组小鼠2月龄开始更换为同性别大笼群养(12~16只·笼⁻¹),丰富小鼠的社会群体生活,促进其典型的种属行为,如打斗、嬉戏和群体性睡眠等^[9]。每周在笼内放置一个不同的玩具,如吊环、跑轮、管道或各种不同形状的物体^[10-11],以提供逃避场所、促进运动锻炼行为,增加新奇刺激等,直至实验结束。

小鼠分为青年(3月龄)、中年(12月龄)和老

年(18月龄)3组。3月龄仅有青年对照,中年和老年组均有对照组、应激组和EE组。实验开始前剔除有视力障、运动障碍和可见明显肿块的小鼠。最终小鼠数量为:青年对照组雌雄各12只;中老年组的3个亚组(对照、应激和EE组)雌雄各8只。

1.2 行为学检测

1.2.1 黑白巷 木制盒子(120cm×9cm×30cm)内壁一半漆白色和一半漆黑。小鼠从黑端放入,记录90s内小鼠首次从黑端进入白端的时间(潜伏期)、在黑端停留的总时间和黑到白端的次数。

1.2.2 旷场 装置为一无盖木盒(81cm×81cm×28cm),内为黑色,底用白线分为16个等大方格。旷场中心放一彩色玩具以激发小鼠好奇心。装置中央高2.8m处悬挂一个40W白炽灯以照明。小鼠从一角放入,自由探索5min。每只小鼠接受1次测试,记录跨越的线条总数、周边时间(在周边12格的总时间)和潜伏期(离开首格耗费的时间)。每次测试结束后用70%酒精清理木盒。

1.3 统计学处理

资料用均数±标准差表示。采用两因素方差分析对年龄或处理和性别效应进行检验,多重比较采用Fisher最小显著性差异检验。检验水准设定 $\alpha=0.05$ 。所有分析由SPSS 16.0统计软件完成。

2 结果与分析

2.1 旷场

2.1.1 年龄效应 3个年龄段对照组间的潜伏期 $[F_{(2,50)}=7.050, P=0.002]$ 、周边时间 $[F_{(2,50)}=6.369, P=0.003]$ 和跨格子数 $[F_{(2,50)}=4.023, P=0.024]$ 均有显著差异。雄鼠的周边时间长于雌鼠 $[F_{(1,50)}=7.889, P=0.007]$ 。多重比较显示,老年对照组潜伏期长于青年和中年对照组($P_s < 0.001, = 0.034$),周边时间长于青年对照组($P=0.001$),跨格子数少于青年对照组($P=0.007$)。

2.1.2 处理效应 12月龄对照、应激和EE组间周边时间 $[F_{(2,42)}=5.043, P=0.011]$ 和跨格子数 $[F_{(2,42)}=3.242, P=0.049]$ 有显著差异,潜伏期无显著差异($P > 0.05$)。雄鼠周边时间显著长于雌鼠 $[F_{(1,42)}=10.067, P=0.003]$ 。多重比较显示应激组周边时间($P=0.046, 0.003$)长于对照组和EE组,跨格子数($P=0.036, 0.030$)少于对照组和EE组。

18月龄对照、应激和EE组小鼠仅周边时间 $[F_{(2,42)}=3.277, P=0.048]$ 有显著组间差异。雄鼠周边时间显著长于雌鼠 $[F_{(1,42)}=5.659, P=0.022]$ 。多重比较显示应激组周边时间($P=0.021$)高于EE组、

临界高于对照组 ($P = 0.055$)。

2.2 黑白巷

2.2.1 年龄效应 3 个年龄段对照组之间潜伏期 [$F_{(2,50)} = 4.276, P = 0.019$]、黑端时间 [$F_{(2,50)} = 5.597, P = 0.006$] 和黑到白端次数 [$F_{(2,50)} = 3.452, P = 0.039$] 均有显著差异。性别差异不显著 [$F_{(1,50)} = 1.038, P = 0.372$]。多重比较显示, 老年和中年对照组黑端时间 ($P = 0.002, 0.042$) 长于青年对照组、黑到白端次

数 ($P = 0.024, 0.045$) 少于青年对照组。老年对照组潜伏期长于青年对照组 ($P = 0.005$)。

2.2.2 处理效应 中年对照、应激和 EE3 组间小鼠黑端时间 [$F_{(2,42)} = 5.169, P = 0.010$] 差异显著, 即应激组小鼠黑端时间长于 EE 组和对照组 ($P = 0.005, 0.012$), 但潜伏期和黑到白端次数均无显著差异 ($P > 0.05$)。性别效应不显著 [$F_{(1,42)} = 2.059, P = 0.153$]。

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 Index	3 月龄 3 months old		12 月龄 12 months old	
		对照组 CK	对照组 CK	应激组 Stress group	丰富环境组 Enriched-environment group
旷场 Open field	潜伏期/s	6.02±1.18	8.56±1.64	9.93±1.64	9.16±1.64
	周边时间/s	250.09±4.47	260.73±5.05 [†]	274.39±5.05	253.69±5.05 [†]
	跨格子数	156.00±6.46	147.31±6.52 [†]	127.06±6.52	148.00±6.52 [†]
黑白巷 Black-white alley	潜伏期/s	11.62±1.15	14.28±1.72	18.38±1.72	15.14±1.72
	黑端时间/s	46.08±2.11	53.21±2.99 ^{**†}	64.42±2.99	51.83±2.99 [†]
	黑到白端次数	5.54±0.44	4.06±0.33 [*]	3.13±0.33	4.00±0.33
18 月龄 18 months old					
		对照组 CK	应激组 Stress group	丰富环境组 Enriched-environment group	
		13.02±2.55 ^{*#}	14.01±2.55	12.825±2.55	
		275.29±2.88 [*]	283.06±2.88	273.59±2.88 [†]	
		127.19±7.96 [*]	119.75±7.96	131.31±7.96	
		17.00±1.60 [*]	21.21±1.60	15.51±1.60 [†]	
		57.18±2.18 [*]	60.36±2.18	53.49±2.18 [†]	
		3.88±0.48 [*]	3.50±0.48	4.44±0.48	

注: “*” 表示老年组和中年对照组与青年对照组相比有显著性差异; “#” 表示老年组与中年组相比有显著差异; “†” 表示 12 月龄或 18 月龄对照组和丰富环境组与应激组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: “*” represents there is statistically significant in the older, middle-aged control group and the young group; “#” represent there was statistically significant in the older, and the middle-aged group; “†” represents there is statistically significant in 12 months old and 18 months old control group, stress group and enriched-environment group ($P < 0.05$).

老年 3 组间黑端时间 [$F_{(2,42)} = 4.396, P = 0.018$]、潜伏期 [$F_{(2,42)} = 3.917, P = 0.036$] 差异显著, 即应激组黑端时间和潜伏期长于 EE 组 ($P = 0.034, 0.017$), 潜伏期临界长于对照组 ($P = 0.074$)。但黑到白端次数 [$F_{(2,42)} = 0.929, P = 0.403$] 无显著差异, 性别无显著效应 [$F_{(1,42)} = 0.586; P = 0.565$]。

3 讨论

人类和啮齿类动物的随着年龄增加, 其焦虑水平表现出年龄相关性改变^[12-13], 同时其认知功能也受到显著影响。例如, 老年昆明小鼠的焦虑性在旷场实验中显著增高于青年小鼠, 而自由探索活性则显著降低于青年小鼠^[14]。与之相一致, 本研究的结

果表明老年对照 CD-1 小鼠焦虑性显著高于青年对照组。这表现为老年对照组在旷场任务中的潜伏期、周边时间显著增加, 在黑白巷中的黑端时间、潜伏期显著延长, 从黑到白端次数显著减少。同时, 老年对照组自发探索活性也减弱 (跨越格子数显著减少)。

研究发现生命早期心理社会环境改变^[11,15]或母体孕期炎症反应^[16-17]也参与了脑衰老相关行为如焦虑水平、记忆功能的改变。生命早期不同的心理社会环境改变对中老年小鼠焦虑和自发探索活性可能产生影响, 但目前的研究尚少。既往研究表明, 青春小鼠 (6 周龄) 接受短期束缚应激后, 其成年后在高架十字迷宫和黑白巷实验的焦虑行为增加, 其兴奋性突触后电位显著减低^[18]。3 周龄小鼠接受

足电击处理后抑郁和焦虑行为增加,神经解剖学和电生理功能改变,且伴随5-羟色胺功能障碍^[19]。对SD大鼠采取电击等方式同样发现其2周后的焦虑性显著增加^[20]。但是,这种应激反应对焦虑行为的效应是否为终生性尚未见报道。本研究采用多种应激原组成的慢性复合应激来模拟人类慢性应激状态^[4]。本研究结果表明,12月龄应激组的焦虑性显著高于同龄EE组和对照组,表现在旷场中的周边时间和在黑白巷中的黑端时间显著延长。同时,其跨越格子数也显著减少,提示自发探索活性减退。这种青年早期(2月龄)慢性应激对中年雄鼠的影响大于雌鼠。但是,随着年龄的增加,这种应激处理效应逐渐减弱,表现为老(18月)龄应激组小鼠在旷场中的周边时间和在黑白巷中的黑端时间、潜伏期仅显著高于EE丰富环境组,与同龄对照组的差异仅达临界水平,而自发探索活性3组间无差异。说明青年早期的慢性应激对焦虑和探索行为的影响在中年期达到高峰,进入老年阶段有所下降(尤其是探索活性),这种慢性应激的效应可因EE操作而显著抵消。

对老年小鼠而言,我们的结果还提示EE虽然可以显著改善其焦虑行为,但对自发探索活性没有影响。既往对SD大鼠早期接受长时间(12周)EE处理,发现其成年后探索活性增加,但是焦虑行为未见显著改变^[21]。这可能与种属、评估方法和评估时间(阶段)的不同有关。我们将进一步完善评估方法和构建不同种属研究,探索这种中老年期神经行为改变的机制。

参考文献:

- [1] 周科成, 佳娜提, 吴黄辉, 等. 急、慢性束缚应激对小鼠情绪和学习记忆能力的不同影响[J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(2): 145-148.
- [2] NOH Y, JEON S, LEE J M, et al. Anatomical heterogeneity of Alzheimer disease: based on cortical thickness on MRIs[J]. *Neurology*, 2014, 83(21): 1936-1944.
- [3] Barker D J P. The developmental origins of adult disease[J]. *J Am Coll Nutr*, 2004, 23(sup6): 588S-595S.
- [4] 程少容, 王仁法, 李勇刚, 等. 慢性复合应激对大鼠学习记忆及海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚基表达的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(28): 123-125.
- [5] CALFA G, CHAPLEAU CA, CAMPBELL S, et al. HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons[J]. *Hippocampus*, 2012, 22(7): 1493-1500.
- [6] OSTOJIĆ S, PEREZA N, KAPOVIĆ M. A current genetic and epigenetic view on human aging mechanisms[J]. *Coll Antropol*, 2009, 33(2): 687-699.
- [7] ASHE K H, ZAHS K R. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice[J]. *Neuron*, 2010, 66(5): 631-645.
- [8] MOLTENI R, ROSSETTI A C, SAVINO E, et al. Chronic mild stress modulates activity-dependent transcription of BDNF in rat hippocampal slices[J]. *Neural Plast*, 2015, 2016: 2592319.
- [9] VAN LOO P L, VAN DE WEERD H A, VAN ZUTPHEN L F, et al. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice[J]. *Lab Anim*, 2004, 38(2): 178-188.
- [10] KOBILO T, LIU Q R, GANDHI K, et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment[J]. *Learn Mem*, 2011, 18(9): 605-609.
- [11] MERING S, JOLKKONEN J. Proper housing conditions in experimental stroke studies-special emphasis on environmental enrichment[J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 106.
- [12] 厉雪艳, 陈贵海. 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[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(2): 192-195.
- [13] 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.
- [14] 陈贵海, 张李群, 周江宁. 年龄及性别对小鼠新物体再认能力和旷场行为的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(4): 107-109.
- [15] SIMONE-FREILICHER E, RUPLEY A E. Juvenile psittacine environmental enrichment[J]. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2015, 18(2): 213-231.
- [16] 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(2): 267-279.
- [17] 李学伟, 陈贵海, 马汉, 等. 胚胎期暴露氟戊菊酯对中年 CD-1 小鼠空间学习记忆能力的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(3): 337-340.
- [18] NEGRÓN-OYARZO I, PÉREZ MÁ, TERREROS G, et al. Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic cortex[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 259: 342-353.
- [19] SHIKANAI H, KIMURA S, TOGASHI H. Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(9): 1392-1395.
- [20] KINN RØD A M, MILDE A M, GRØNLI J, et al. Long-term effects of footshock and social defeat on anxiety-like behaviours in rats: relationships to pre-stressor plasma corticosterone concentration[J]. *Stress*, 2012, 15(6): 658-670.
- [21] PEÑA Y, PRUNELL M, ROTLLANT D, et al. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(9): 1390-1404.