文章编号:1000-5404(2013)03-0233-04

论著

早年慢性应激对青春期大鼠攻击行为及下丘脑腹内侧核和前额皮质脑源性神经营养因子表达的影响

雷 莉[1],张 艳[1],胡 华[1],秦光成[2],陈力学[2],屈 远[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:心理卫生中心[1],神经病学实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨早年慢性应激对青春期大鼠攻击行为以及大脑下丘脑腹内侧核和前额皮质脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响。**方法** 将20只SD大鼠分为实验组和对照组。实验组大鼠出生后21 d开始进行社会孤养、日夜颠倒、社会刺激性实验和居住-入侵实验等多种早年应激3周。免疫组化检测下丘脑腹内侧核和前额皮质BDNF的表达。**结果** 实验组在居住-入侵实验和中性环境实验中攻击/威胁比[分别为(12.45±9.27)、(10.84±4.93)]和攻击持续时间[分别为(333.10±76.34)、(322.20±57.67)s]均显著高于对照组($P<0.01$),而攻击潜伏期[分别为(15.20±11.07)、(18.30±11.32)s]显著低于对照组($P<0.01$),并且表现出暴力攻击行为。免疫组化检测结果显示,实验组下丘脑腹内侧核BDNF表达(0.20±0.09)高于对照组($P<0.05$),前额皮质BDNF(0.19±0.08)表达水平低于对照组($P<0.05$)。**结论** 早年慢性应激引起青春期大鼠暴力攻击行为以及下丘脑腹内侧核和前额皮质BDNF表达改变,提示青春期暴力攻击行为可能与早年慢性应激所致BDNF表达改变有关。

[关键词] 早年慢性应激;攻击行为;BDNF
[中图法分类号] R338.6; R339.32; R363.27 [文献标志码] A

Effect of early chronic life stress on aggressive behavior and expression of brain-derived neurotrophic factor in hypothalamus and prefrontal cortex in puberty rats

Lei Li[1], Zhang Yan[1], Hu Hua[1], Qin Guangcheng[2], Chen Lixue[2], Qu Yuan[1] ([1]Department of Psychiatry, [2]Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of early chronic life stress on aggressive behavior and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) of ventromedial hypothalamus nucleus and prefrontal cortex in puberty rats. **Methods** Twenty rats were randomly divided into 2 groups: an experimental group and a control group. The rats of the experimental group were given a series of stress including social isolation, reversal of day and night, social stimulation and resident-intruder confrontation at the 21st day after birth for 3 weeks. The expression of BDNF in ventromedial hypothalamus nucleus and prefrontal cortex was determined by immunohistochemistry. **Results** The attack/threat (A/T) ratio (12.45±9.27, 10.84±4.93) and duration of attack manifestations (DAM) (333.10±76.34, 322.20±57.67) in resident-intruder test and neutral arena test increased significantly in the experimental group as compared with the control group ($P<0.01$), while the latency of the first attack (15.20±11.07, 18.30±11.32 s) decreased significantly ($P<0.01$). Moreover, the rats of experimental group exhibited violence behavior. Compared with the control group, the expression of BDNF elevated significantly in ventromedial hypothalamus nucleus (0.20±0.09, $P<0.05$), and decreased significantly in prefrontal cortex (0.19±0.08, $P<0.05$) in the experimental group. **Conclusion** The violence behavior in puberty rats induced by early chronic life stress may be associated with the altered expression of BDNF in ventromedial hypothalamus nucleus and prefrontal cortex.

[**Key words**] early chronic life stress; aggressive behavior; BDNF

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10104) and the Foundation of Chongqing Medical University for National Natural Science Pilot Research (NSFYY201111). Corresponding author: Hu Hua, E-mail: huhua6688@sina.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA10104);重庆医科大学国家自然科学预研资助项目(NSFYY201111)
[通信作者] 胡 华,E-mail: huhua6688@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1023.018.html(2012-12-07)

应激是可影响特定年龄阶段和社会情境中个体身心健康的一种环境事件或长期状况[1]。研究发现,抑郁[2]、焦虑[3]和创伤后应激障碍[4]等多种精神病理状态均和应激存在密切联系,甚至暴力犯罪也与某些应激类型相关[5]。而暴力(violence)是一种极端攻击行为,表现为极端地采用任何形式的、有目的地、伤害另一生物体而该生物体所不愿接受的行为。

目前公认下丘脑及前额叶皮质作为"攻击相关中枢"的一部分。在神经内分泌方面,攻击行为与中枢神经系统相应脑区的多种生化物质相关,其中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)有助于大脑发育、突触可塑性和多巴胺能与单胺能神经元分化[6]。已发现内源性BDNF耗竭可通过引起5-羟色胺(5-HT)异常而增强大鼠攻击性[7],而BDNF可受到多种因素影响。

近来研究报道BDNF已作为调节早年负性事件影响的候选物质[8]。目前国内外虽有应激或攻击行为与BDNF之间的关系报道,如发现经过应激部分脑区的BDNF表达发生改变,但却少见探讨三者之间联系的研究。因此,在现代社会青少年暴力犯罪逐年上升的今天,探讨早年应激与青春期暴力攻击行为及与BDNF的关系更加重要。本研究通过观测前额皮质和下丘脑腹内侧核BDNF的表达,从神经可塑性异常方面探讨早年慢性应激对大脑的影响及与动物暴力行为之间可能存在的联系,旨在为进一步研究暴力攻击行为的神经生物学机制和预防干预奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

BDNF抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,SC-20981);羊抗兔二抗(Invitrogen公司,862150A);DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,11182A12)。

1.2 实验动物

出生后第21天健康雄性SD大鼠30只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,体质量40~60 g),分为对照组(10只)和实验组(10只),其余为用作干预的入侵鼠(10只)。对照组和入侵鼠采用分笼群居喂养(每笼5只,每组2笼),实验组每只使用小笼单独喂养。饮食和饮水自由,自然昼夜周期光照,标准温度和适度。

1.3 早年慢性应激

1.3.1 早年孤养 实验组于断奶后第21天开始进行孤养,提供正常条件的食物、温度、湿度(共3周)。

1.3.2 社会刺激 第35天开始进行每周2次的社会刺激性实验,每次15 min,共3周。包括社会刺激性(将入侵鼠放入居住鼠笼内,在2只鼠之间隔一铁丝网,预刺激5 min,随后立即将2只鼠放入另一较大笼内,观察攻击行为10 min)和非奖赏性挫折(出生后第28天开始给予2%蔗糖水,至第35天开始,每次攻击实验前蔗糖水浓度降至一半)。

1.3.3 居住-入侵实验 每天进行1次居住-入侵鼠实验,每次持续10 min,共3周,以增加应激水平。

1.3.4 昼夜颠倒 自第21天之后实验组每日进行昼夜颠倒(每日8:00~20:00遮蔽光照,20:00~8:00进行光照),共3周。

1.4 行为学检测

大鼠连续早年应激至出生后第58天(大鼠青春期),进行行为学测试。具体包括:居住-入侵实验和中性环境实验各10 min,使用摄影机对进行居住-入侵实验和中性环境实验的大鼠进行暗室摄影,然后通过2名实验员分别对记录的实验影像资料进行攻击行为分析,然后取2人的平均值进行数据分析。

居住-入侵实验:将1只入侵大鼠放入实验组大鼠居住笼中,记录实验组大鼠攻击行为用以检测大鼠攻击水平。

中性环境实验:将1只实验组或对照组大鼠与1只入侵鼠同时放入1个新笼中,记录其攻击行为。

攻击行为:①攻击性理毛行为;②追逐;③咬;④攀压。动物暴力攻击行为:①明显缩短的第1次撕咬击潜伏期;②明显升高的攻击/威胁比例;③攻击要害部位(头、腹部和喉部);④严重的攻击后果(出血、受伤或死亡),继续攻击屈服的对手;⑤攻击时忽视对手状况(活动、静止、死亡)和环境(居住笼、中性环境)。

动物暴力其标准定义为以下2种:①定性标准,即攻击对方要害部位(头、腹、喉)、攻击行为脱离环境(攻击时忽视对方的性别、状态和环境)以及攻击之前缺乏仪式行为(通过攻击/威胁比例来测量);②定量标准,即攻击潜伏期缩短、攻击总时间延长和攻击撕咬频繁[9]。

1.5 标本取材

行为学实验结束后,青春期大鼠经10%水合氯醛进行麻醉(0.30 mL/100 g)后心脏灌注(每只300 mL 4%多聚甲醛和300 mL 0.01 mol/L PBS缓冲液,以灌注时出现四肢抽搐后颈部僵硬可认为灌注良好)。断头并取出大脑下丘脑(前囟-2.8 mm)和前额皮质(前囟5.20 mm)。最后进行组织石蜡包埋,连续冠状切片。

1.6 免疫组化染色

使用北京中杉分装的BDNF试剂盒(SC-20981),检测2组大鼠下丘脑和前额皮质BDNF表达。详细步骤:常规石蜡切片脱蜡至水,0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)中10 min热修复,滴加正常山羊血清封闭液(室温20 min),然后滴加一抗(4 ℃过夜)。滴加生物素化羊抗兔二抗IgG(862150A)37 ℃反应30 min,DAB显色(镜下,室温),直到目标产物显现为棕黄色,背景呈浅棕色。苏木精复染,显微镜(日本奥林巴斯BX51T-PHD-J11)观察、照相。Image Pro Plus 6.0软件对切片进行分析,每个部位选择5个视野,计算平均光密度值(AOD)。

1.7 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 居住-入侵实验

实验组与对照组相比,继续攻击次数、攻击要害部位次数、攻击/威胁比、攻击潜伏期和攻击持续时间差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 2 组居住-入侵实验攻击行为比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	继续攻击次数	攻击要害部位次数	攻击/威胁比	攻击潜伏期(s)	攻击持续时间(s)
实验组	10.10±2.23[a]	10.40±6.00[a]	12.45±9.27[a]	15.20±11.07[a]	333.10±76.34[a]
对照组	0.00±0.00	0.20±0.42	3.58±2.25	66.30±21.68	34.50±27.49

a: $P<0.01$,与对照组比较

2.2 中性环境实验

实验组与对照组相比,继续攻击次数、攻击要害部位次数、攻击/威胁比、攻击潜伏期和攻击持续时间差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

表 2 2 组中性环境实验攻击行为比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

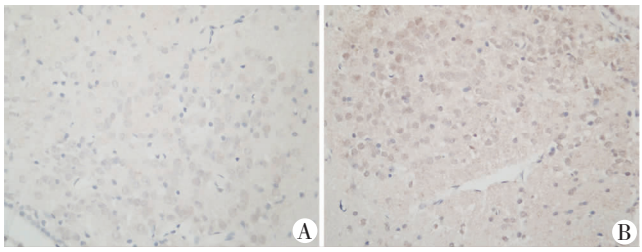
组别	继续攻击次数	攻击要害部位	攻击/威胁比	攻击潜伏期(s)	攻击持续时间(s)
实验组	8.80±5.65[a]	9.80±4.39[a]	10.84±4.93[a]	18.30±11.32[a]	322.20±57.67[a]
对照组	0.00±0.00	0.10±0.32	2.96±1.62	68.10±20.96	24.40±12.53

a: $P<0.01$,与对照组比较

实验组大鼠在居住-入侵实验和中性环境中,继续攻击次数、攻击要害部位次数、攻击/威胁比、攻击潜伏期和攻击持续时间差异均无统计学意义($P>0.05$),提示实验组大鼠攻击行为不受环境影响。

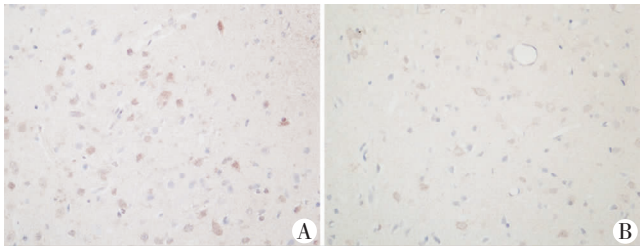
2.3 BDNF 免疫组织化学结果

实验组与对照组相比,下丘脑腹内侧区 BDNF 阳性神经元光密度升高,前额皮质 BDNF 阳性神经元光密度降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1~2、表 3。



A:对照组; B:实验组

图 1 2 组大鼠大脑下丘脑腹内侧核 BDNF 免疫组化结果 (S-P ×400)



A:对照组; B:实验组

图 2 2 组大鼠大脑前额皮质 BDNF 免疫组化结果 (S-P ×400)

表 3 2 组下丘脑腹内侧核和前额皮质 BDNF 表达

(AOD, $n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	下丘脑腹内侧核	前额皮质
实验组	0.20±0.09[a]	0.19±0.08[a]
对照组	0.16±0.06	0.22±0.09

a: $P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

近年来青少年犯罪性质具有反复性和低龄化趋势。因此,探讨青春期攻击行为生物学基础显得更加重要。

本研究通过对大鼠进行早年慢性应激,造成青春期大鼠在居住-入侵实验和中性环境实验中攻击/威胁比和攻击持续时间增加以及攻击潜伏期缩短,提示其攻击性增高;且出现对手屈服后继续攻击和对要害部位进行攻击,以及两个不同攻击环境实验中大鼠攻击行为没有差异,提示已出现暴力攻击行为。虽然机制还在探索之中,但已发现多种早年慢性应激可引起动物攻击性增高,其中大鼠经历断奶后社会孤养甚至出现攻击行为异常模式[10]。因此,本研究将断奶后社会孤养与社会应激、反复居住-入侵实验和日夜颠倒应激合并,致使大鼠攻击行为异常模式更为突出和稳定化,为进一步研究暴力攻击行为的神经生化物质改变奠定了基础。

Hess[11]通过对猫的下丘脑进行电刺激引起攻击行为,此后提出下丘脑"攻击中枢"理论。近来通过光遗传学技术进一步观察到对小鼠下丘脑腹内侧核腹外侧亚区进行刺激显示异常攻击行为,提示下丘脑此区域与攻击行为关系更加密切[12];而前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)能够抑制下丘脑和杏仁体在攻击行为中的促发作用[13]。通过对成年脑损伤患者、攻击性人群和正常成年对照人群进行研究,发现前额皮质腹正中区(ventromedial prefrontal cortex, vmPFC)是控制攻击行为的关键[14-16]。而青少年中枢系统仍处于发育之中,更易受到各种环境因素影响。

本研究结果显示,通过早年慢性应激的青春期大鼠表现出暴力攻击行为,下丘脑腹内侧核 BDNF 较对照组表达增高。关于应激与下丘脑 BDNF 表达的关系,已有研究经过短时间固定应激之后发现下丘脑 BDNF 水平迅速增高,提示 BDNF 可能参与应激反应相关神经可塑性过程[17],且经过慢性应激,也发现下丘脑 BDNF 水平增高[18]。虽然以上实验结果与本实验一致,但另一研究通过 BDNF 杂合子敲除($BDNF^{+/-}$)使大鼠 BDNF 表达部分受损后,发现下丘脑 5-HT 部分突触后受体表达以及大鼠攻击性增高[7]。而上述研究

均未具体到下丘脑腹内侧核区,因此下丘脑腹内侧核BDNF与早年慢性应激及攻击行为之间的关系仍需要进一步研究。

同时本研究通过对青春期病理性攻击大鼠前额皮质BDNF表达进行检测,发现实验组BDNF表达水平低于对照组,提示早年慢性应激可能导致大鼠前额皮质的发育受到影响或神经可塑性异常从而可能导致其对下丘脑攻击行为调控能力下降。关于应激对BDNF表达的影响,已有研究发现应激常和动物海马、新皮质(neocortex)和前额皮质BDNF表达降低相关[19]。已有研究通过对大鼠全脑或者前额叶选择性敲除BDNF等位基因后攻击行为增高来探讨前额皮质BDNF与高攻击性之间的联系[20]。

综上所述,本研究对青春期大鼠进行多种早年慢性应激产生暴力攻击行为,同时发现下丘脑腹内侧核和前额皮质BDNF表达异常,根据BDNF在中枢神经系统的功能,提示早年慢性应激可能通过对攻击相关脑区造成神经可塑性异常导致青春期暴力攻击行为的产生,而早年慢性应激对于成年期暴力攻击大鼠相同脑区BDNF表达的影响以及相关机制则需要进一步研究。目前早年慢性应激对神经精神病理方面的影响已逐渐成为研究热点,但攻击行为的产生不仅与应激因素相关,还往往与遗传因素密切联系。本研究仅从应激角度研究存在一定的局限性,课题组未来将结合遗传因素进一步研究暴力攻击的神经生物学发生机制。

志谢 衷心感谢重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室对本课题的指导与帮助

参考文献:

[1] Grant K E, Compas B E, Stuhlmacher A F, *et al*. Stressors and child and adolescent psychopathology: moving from markers to mechanisms of risk[J]. Psychol Bull, 2003, 129(3): 447-466.

[2] Fagring A J, Kjellgren K I, Rosengren A, *et al*. Depression, anxiety, stress, social interaction and health-related quality of life in men and women with unexplained chest pain[J]. BMC Public Health, 2008(8): 165.

[3] St-Jean-Trudel E, Guay S, Marchand A. The relationship between social support, psychological stress and the risk of developing anxiety disorders in men and women: results of a national study[J]. Can J Public Health, 2009, 100(2): 148-152.

[4] Harvey B H, Brand L, Jeeva Z, *et al*. Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and restress in an animal model of post-traumatic stress disorder[J]. Physiol Behav, 2006, 87(5): 881-890.

[5] Thornhill R, Fincher C L. Parasite stress promotes homicide and child maltreatment[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366(1583): 3466-3477.

[6] Chung S, Chung H Y, Jung J, *et al*. Association among aggressiveness, neurocognitive function, and the Val66Met polymorphism of brain-derived neurotrophic factor gene in male schizophrenic patients[J]. Compr Psychiatry, 2010, 51(4): 367-372.

[7] Lyons W E, Mamounas L A, Ricaurte G A, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(26): 15239-15244.

[8] Cowansage K K, LeDoux J E, Monfils M H. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity[J]. Curr Mol Pharmacol, 2010, 3(1): 12-29.

[9] Natarajan D, Caramaschi D. Animal violence demystified[J]. Front Behav Neurosci, 2010(4): 9.

[10] Toth M, Mikics E, Tulogdi A, *et al*. Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses[J]. Horm Behav, 2011, 60(1): 28-36.

[11] Hess W R. Stammganglien-Reizversuche[J]. Ber Gesamten Physiol, 1928(42): 554-555.

[12] Lin D, Boyle M P, Dollar P, *et al*. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus[J]. Nature, 2011, 470(7333): 221-226.

[13] Davidson R J, Putnam K M, Larson C L. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence[J]. Science, 2000, 289(5479): 591-594.

[14] Damasio H, Grabowski T, Frank R, *et al*. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient[J]. Science, 1994, 264(5162): 1102-1105.

[15] Siever L J, Buchsbaum M S, New A S, *et al*. d, l-fenfluramine response in impulsive personality disorder assessed with [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography[J]. Neuropsychopharmacology, 1999, 20(5): 413-423.

[16] Pietrini P, Guazzelli M, Basso G, *et al*. Neural correlates of imaginal aggressive behavior assessed by positron emission tomography in healthy subjects[J]. Am J Psychiatry, 2000, 157(11): 1772-1781.

[17] Rage F, Givalois L, Marmigere F, *et al*. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats[J]. Neuroscience, 2002, 112(2): 309-318.

[18] Naert G, Ixart G, Maurice T, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress[J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(1): 55-66.

[19] Calabrese F, Molteni R, Racagni G, *et al*. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(Suppl 1): S208-S216.

[20] Ito W, Chehab M, Thakur S, *et al*. BDNF-restricted knockout mice as an animal model for aggression[J]. Genes Brain Behav, 2011, 10(3): 365-374.

(**收稿**:2012-08-24;**修回**:2012-11-19)

(编辑 王小宴)