神经病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000848

束缚应激大鼠下丘脑谷氨酸受体变化和行为绝望状态的关系研究

戴若以[1]，顾小红[1]，张云东[2]，陈 卓[1]
（第三军医大学大坪医院野战外科研究所 1. 老年科；2. 神经外科，重庆 400042）

【摘 要】目的：研究束缚应激和糖皮质激素对大鼠下丘脑谷氨酸 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid，AMPA）受体 GluR2 亚基及谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸（N-methyl-D-aspartic acid，NMDA）受体 NR2B 亚基的影响，并分析谷氨酸受体与行为绝望状态的关系及 CP-154526 干预作用。**方法**：将 30 只雄性大鼠随机分成 3 组：应激组（10 只大鼠，每天给予束缚应激 1 次，连续 21 d）、CP-154526 治疗组（10 只大鼠，每天给予束缚应激 1 次和每日腹腔内注射 CP-154526，连续 21 d）、对照组（10 只大鼠，不予以束缚处理和 CP-154526 干预）。采用每日束缚 3 h，连续 21 d 的方法建立抑郁症模型，通过悬尾实验和强迫游泳实验监测行为学变化，酶联免疫吸附实验检测血浆糖皮质激素（glucocorticoid，GC）浓度，免疫组化法观测下丘脑 AMPA 受体 GluR2 亚基及 NMDA 受体 NR2B 亚基表达，并分析上述结果之间的相关性。**结果**：悬尾实验中，对照组、应激组、CP-154526 治疗组不动时间分别为（118.40 ± 27.36）s、（191.00 ± 28.84）s、（141.60 ± 23.89）s，应激组大鼠悬尾不动时间多于对照组（P=0.001）和 CP-154526 治疗组（P=0.013）；强迫游泳实验中，对照组、应激组、CP-154526 治疗组游泳不动时间分别为（87.20 ± 14.49）s、（145.80 ± 17.45）s、（106.60 ± 14.01）s，应激组游泳不动时间多于对照组（P=0.000）和 CP-154526 治疗组（P=0.002）；对照组、应激组、CP-154526 治疗组血浆 GC 水平分别为（52.61 ± 6.11）μg/L、（194.33 ± 23.30）μg/L、（64.17 ± 19.59）μg/L，应激组血浆 GC 浓度明显高于对照组（P=0.000）和 CP-154526 治疗组（P=0.000）；在免疫组化实验中，对照组、应激组、CP-154526 治疗组 GluR2 亚基表达的平均光密度分别为 0.227 ± 0.031、0.079 ± 0.011、0.169 ± 0.020，应激组大鼠下丘脑 GluR2 亚基平均光密度低于对照组（P=0.000），同时亦明显低于 CP-154526 治疗组（P=0.000）；CP-154526 治疗组大鼠下丘脑 GluR2 亚基平均光密度低于对照组（P=0.000）；对照组、应激组、CP-154526 治疗组 NR2B 亚基表达的平均光密度分别为 0.159 ± 0.021、0.266 ± 0.054、0.168 ± 0.018，应激组大鼠下丘脑 NR2B 亚基平均光密度高于对照组（P=0.000），同时亦高于 CP-154526 治疗组（P=0.000）。悬尾不动时间和强迫游泳不动时间与血浆 GC 浓度和 NR2B 亚基表达呈正相关（r=0.721，P=0.006；r=0.589，P=0.153；r=0.486，P=0.004；r=0.868，P=0.000），和 GluR2 亚基表达呈负相关（r=-0.721，P=0.014；r=-0.812，P=0.012）。**结论**：慢性应激后血浆 GC 浓度上升，下丘脑谷氨酸受体发生继发变化。NMDA 受体 NR2B 亚基增加，而 AMPA 受体 GluR2 亚基减少，并与行为绝望状态相关。CP-154526 可以改善慢性应激大鼠的行为绝望状态。

【关键词】生理应激；抑郁；下丘脑；受体，谷氨酸
【中图分类号】R338.2+7；R749.4+1 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-03-28

Relationship between changes of glutamate receptor in hypothalamus of chronic restraint stress rats and the behavioral despair

Dai Ruoyi[1]，*Gu Xiaohong*[1]，*Zhang Yundong*[2]，*Chen Zhuo*[1]
（*1. Department of Geriatrics；2. Department of Neurologic Surgery，Daping Hospital，Third Military Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To research the effect of restraint stress and glucocorticoid on the expression of AMPA receptors GluR2 subunit，NMDA receptor NR2B subunit and the intervention effect of CP-154526. ***Methods***：A total of 30 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups：restraint stress group（10 rats receiving restraint stress once a day over a period of 21 days）；CP-154526 treatment group（10 rats receiving restraint stress and intraperitoneal injection of CP-154526 once a day over a period of 21 days）；control group（10 rats receiving no restraint stress and no intervention of CP-154526）. Sprague-Dawley rats received restraint stress for 3 h daily over a period of 21 days to make the depression model. Then the behaviors of rats were observed by tail suspension test and forced swimming test. The levels of glucocorticoid in rat blood serum were observed by enzyme-linked

作者介绍：戴若以，Email：285405195@qq.com，研究方向：应激的下丘脑可塑性机制。
通信作者：顾小红，Email：742738605@qq.com。
基金项目：重庆市自然科学基金资助项目（编号：cstc2013jjB10002）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2128.040.html（2016-01-19）

immunosorbent assay. And the expression of AMPA receptors GluR2 subunit and NMDA receptor NR2B subunit in hypothalamus were observed through immunohistochemical assay and the correlation between results was assessed. ***Results***: In the tail suspension test, the immobility times in control group, stress group, CP-154526 treatment group were (118.40 ± 27.36) s, (191.00 ± 28.84) s, (141.60 ± 23.89) s; stress group showed increased immobility time compared with that of control group (P=0.001) and CP-154526 treatment group (P=0.013). In the forced swimming test, the swimming immobility times in control group, stress group, CP-154526 treatment group were (87.20 ± 14.49) s, (145.80 ± 17.45) s, (106.60 ± 14.01) s and the swimming immobility time of stress group was higher than that of control group (P=0.000) and CP-154526 treatment group (P=0.002). The serum GC concentration in the control group, stress group, CP-154526 treatment group were (52.61 ± 6.11) μg/L, (194.33 ± 23.30) μg/L, (64.17 ± 19.59) μg/L, and the stress group showed significant increase in the serum glucocorticoid concentration compared with that of control group (P=0.000) and CP-154526 treatment group (P=0.000). In the immunohistochemistry experiments, the average optical density value of GluR2 subunit in control group, stress group, CP-154526 treatment group were 0.227 ± 0.031, 0.079 ± 0.011, 0.169 ± 0.020, the average optical density value of GluR2 subunit in the stress group was lower than that of control group (P=0.000) and CP-154526 treatment group (P=0.000). The average optical density value of GluR2 subunit in the CP-154526 treatment group was lower than that of control group (P=0.000). The average optical density value of NR2B subunit in the control group, stress group, CP-154526 treatment group were 0.159 ± 0.021, 0.266 ± 0.054, 0.168 ± 0.018, and the average optical density value of NR2B subunit in the stress group was higher than that of control group (P=0.000) and CP-154526 treatment group (P=0.000). The tail suspension immobility times and swimming immobility times were positively correlated with serum GC level and the expression of NR2B subunit (r=0.721, P=0.006; r=0.589, P=0.153; r=0.486, P=0.004; r=0.868, P=0.000). But tail suspension immobility times and swimming immobility times were negatively correlated with the expression of GluR2 subunit (r=-0.721, P=0.014; r=-0.812, P=0.012). ***Conclusion***: Plasma concentration of glucocorticoid after chronic stress is increased, and the glutamate receptor in the hypothalamus is changed. The up-regulation of expression of NR2B subunit and down-regulation of expression of GluR2 subunit in hypothalamus are related with the behavioral despair. The CP-154526 can improve the behavioral despair of rats with chronic stress.

【Key word】physiological stress; depression; hypothalamic; receptors, glutamate

随着现代社会人类承受的生活、工作压力不断增加，加之缺乏健康有效的心理调节，这些压力作为应激源对人体健康十分不利，会导致如抑郁症、创伤后应激障碍等许多躯体或精神疾病。应激是机体针对外环境剧变出现的综合应答状态，而下丘脑-垂体-肾上腺（hypothalamus-pituitary-adrenal，HPA）轴在应激反应发生发展过程中发挥着核心作用。慢性应激时下丘脑形态、神经支配分布和蛋白表达会发生可塑性改变，下丘脑室旁核（hypothalamic paraventricular nucleus，PVN）合成和释放的促肾上腺皮质激素释放激素（corticotropin releasing hormone，CRH）增加，CRH 刺激垂体分泌促肾上腺皮质激素（adreno-cortico-tropic-hormone，ACTH），ACTH 继而引起肾上腺皮质糖皮质激素（glucocorticoid，GC）分泌增加[1]。HPA 轴反应性增加，导致一系列应激后心理和生理改变[2]。HPA 轴活动性长期处于高亢状态，GC 过度分泌，则会出现一系列不良应激反应[3]。谷氨酸受体可能也参与了应激反应的病理生理过程[4]。应激可诱导谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸（N-methyl-D-aspartic acid，NMDA）受体 NR2B 亚基在海马组织高表达，参加了应激后HPA活性的调节[5]。同时应激可导致谷氨酸 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸（α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid，AMPA）受体 GluR2 亚基表达降低，继而导致 AMPA 受体通道的钙内流增高，产生细胞毒性作用及长时程增强（long-term potentiation，LTP），这就是“GluR2 假说”[6]。悬尾实验和强迫游泳实验均是检测实验动物应激后抑郁程度的常用行为学实验，反应了模型行为绝望状态。本研究采用容器束缚法建立慢性应激大鼠模型，检测大鼠行为学、血浆 GC 浓度、下丘脑谷氨酸受体的变化及促肾上腺皮质激素释放激素 1 受体（corticotropin 2 releasing hormone type 1 receptor，CRH1R）拮抗剂 CP-154526 对上述指标的干预作用，旨在探索慢性应激后下丘脑谷氨酸受体变化与 GC 分泌和大鼠行为绝望状态的关系，从而为探索慢性应激后抑郁症的发病机制和治疗方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选成年（3 月）雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只（由第三

军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，并经大坪医院实验动物伦理委员会的审查批准）。领取大鼠后实验室适应性喂养 7 d，12 h 明/12 h 暗周期（光照时间 7:00/19:00）。室内温度保持为（22±2）℃，相对湿度保持为 30%~40%，各组大鼠喂常规饲料，自由进食饮水。实验期间除了行为测试和应激处置时段，所有动物自由饮水、进食。用随机排列表法将大鼠分为 3 组：应激组（n=10）、CP-154526 治疗组（n=10）、对照组（n=10）。束缚应激作为一种非损伤性刺激，与人类心身性疾病的过程有相似性，且造模方法成熟通用，故本研究采用自制束缚筒制动法造模。将应激模型组和 CP-154526 治疗组大鼠置于不能自由活动的束缚器内进行应激。束缚器管状，长约 25 cm，筒口内径 8.0 cm，前端有通气孔用于动物呼吸外界空气，尾端为设计一可关闭的圆形门。圆筒四周开有多个通气孔，不影响呼吸与排泄，一端设计为可调节长短使大鼠不受挤压，但不能转身。应激组和 CP-154526 治疗组大鼠每天给予束缚应激 1 次，每次 3 h，于上午 8:00~11:00 进行，连续 21 d。束缚应激 CP-154526 治疗组为自造模第 1 日始，每日腹腔内注射 CP-154526[5 mg/(kg·d)]，其余组注射 CP-154526 的溶解剂 DMSO 作为参照。累计束缚 21 d。未应激大鼠行抓取动作后放入饲养笼内，但在应激期间同应激组大鼠一样禁食、禁水。

1.2 试剂和仪器

糖皮质激素（glucocorticoid，GC）ELISA 试剂盒（Cloud-Clone Corp，美国）；GluR2 免疫组化试剂盒（BOSTER，中国）；NR2B 免疫组化试剂盒（BOSTER，中国）；羊抗兔 HRP 标记二抗（BOSTER，中国）；生物素化羊抗兔 IgG（1B200，北京中山）；CP-154526（Santa Cruz Biotechnology，美国）；自制束缚管；酶标仪（BioTek 美国）；生物素-亲和素-辣根过氧化物酶（1B200，北京中山）。

1.3 悬尾实验

每组大鼠各取 5 只参加悬尾实验采用透明胶带将大鼠尾巴黏附悬挂在固定铁架上，头向下倒立。大鼠头部距底面约 20 cm。整个实验过程在安静、密闭的环境中进行，以防噪音和外界刺激对实验结果造成影响。实验计时 6 min，观察并记录大鼠 6 min 内的不动时间。

1.4 强迫游泳实验

每组剩下 5 只未参加悬尾实验的大鼠进行强迫游泳实验。强迫游泳实验前 1 d 先进行预游泳训练。正式实验时，将大鼠置于直径约 40 cm，深 60 cm 的桶中，水深为 30 cm，水温（18±3）℃，使大鼠直立无法触及水槽底部，跳跃无法跳出水槽。计时 6 min，观察并记录大鼠最后 3 min 的不动时间（上身相对静止不动，下肢踩假水算作不动）。

1.5 血浆 GC 含量测定

造模第 22 天，将 3 个组全部 30 只大鼠全部颈椎迅速脱臼，手术剪剖开胸腔，用注射器从左心房抽取约 3 ml 血，将血浆置于用 EDTA-Na_2 抗凝剂处理过的试管内，混匀，4 ℃下 3 000 r/min 离心 15 min，分离血浆，将上清转移至一新离心管，采用 ELISA 法测量 GC 浓度。CRH 的测定均严格按照 Cloud-Clone Corp 公司的（CRH）ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.6 取材与免疫组化实验

3 组 30 只大鼠取血后左心房插管，0.9%氯化钠溶液灌流冲洗（200~300 ml）；继之灌入预冷的 4%多聚甲醛溶液 300 ml，约为 25 min；迅速分离脑组织，立即置于 4%多聚甲醛溶液中 4 ℃后固定 12 h。然后将脑组织移至 20%的蔗糖溶液中 4 ℃保存。用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗脑中的残留固定液，重复 6次，每次 1 h；再依次移入 75%、80%、95%及 100%的梯度酒精中脱水，二甲苯透明，浸蜡，包埋后，进行连续石蜡冠状切片，片厚约 15 μm；42 ℃温水中漂片，然后将切片放入 45 ℃恒温箱中烤片 5 h，以使切片紧密黏附。石蜡切片脱蜡至水：二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各 5 min，100%乙醇 2 min，95%、80%乙醇各 1 min，蒸馏水 2 min；苏木素液染色 30 min，自来水中冲洗多余染色液，15 min；1%盐酸酒精混合液分化 15 s；自来水中返蓝，15 min；0.5%伊红复染 2 min；95%、95%、100%、100%乙醇脱水，各 1 min；二甲苯透明 2 次，每次 1 min；中性树胶封片。并用光学显微镜观察下丘脑神经细胞形态学变化。由于每组有 1、2 份切片切片位置和效果不理想，或者免疫组化染色效果不佳，最终每组选取 8 份切片进行观测和计算光密度。

1.7 统计学分析

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，实验数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。对所有的结果进行正态性及方差齐性检验后，对数据采用单因素方差分析方法进行分析，组间两两比较采用 LSD-t 法；行为学和谷氨酸受体变化的相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 悬尾实验结果

表 1 显示：对照组、应激组、CP-154526 治疗组大鼠悬尾不动时间分别为（118.40±27.36）s、（191.00±28.84）s、（141.60±23.89）s，3 组悬尾不动时间之间差异有统计学意义（F=9.590，P=0.003）。应激组大鼠悬尾不动时间多于对照组（P=0.001），应激组大鼠悬尾不动时间同时也远多于 CP-154526 治疗组（P=0.013），差异均有统计学意义。而 CP-154526 治疗组和对照组在悬尾不动时间上无统计学意义差别（P=0.196）。

表 1 各组悬尾实验结果（n=5，$\bar{x}\pm s$）

Tab.1 Results of tail suspension test in each group（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	不动时间（s）
对照组	5	118.40±27.36[a]
应激组	5	191.00±28.84[b]
CP-154526治疗组	5	141.60±23.89[c]
F 值		9.590
P 值		0.003

注：采用 LSD 法两两比较，a.与应激组比较 P=0.001；b.与 CP-154526 治疗组比较 P=0.013；c.与对照组比较 P=0.196

2.2 强迫游泳实验结果

表 2 显示：对照组、应激组、CP-154526 治疗组大鼠游泳

不动时间分别为(87.20 ± 14.49) s、(145.80 ± 17.45) s、(106.60 ± 14.01) s。各组大鼠强迫游泳不动时间之间差异有统计学意义(F=18.796, P=0.000)数据可见应激组大鼠强迫游泳不动时间多于对照组(P=0.000)差异有统计学意义，应激组大鼠强迫游泳不动时间也高于 CP-154526 治疗组(P=0.002)，差异有统计学意义。而 CP-154526 治疗组和对照组在强迫游泳不动时间上无统计学意义差别(P=0.070)。

表 2 各组强迫游泳实验结果（n=5, $\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Results of forced swimming test in each group (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	不动时间（s）
对照组	5	87.20 ± 14.49[a]
应激组	5	145.80 ± 17.45[b]
CP-154526治疗组	5	106.60 ± 14.01[c]
F 值		18.796
P 值		0.000

注：采用 LSD 法两两比较，a.与应激组比较 P=0.000；b.与 CP-154526 治疗组比较 P=0.002；c.与对照组比较 P=0.070

2.3 血浆 GC 含量

表 3 显示：对照组、应激组、CP-154526 治疗组大鼠血浆 GC 水平分别为(52.61 ± 6.11) μg/L、(194.33 ± 23.30) μg/L、(64.17 ± 19.59) μg/L。各组大鼠血浆 GC 含量差异有统计学意义(F=192.756, P=0.000)；应激组血浆 GC 浓度明显高于对照组，差异有统计学意义(P=0.000)；应激组血浆 GC 浓度也高于 CP-154526 治疗组，差异有统计学意义(P=0.000)；而CP-154526 治疗组和对照组血浆 GC 浓度比较接近，差异无统计学意义(P=0.161)。

表 3 各组血浆 GC 水平（μg/L, n=10, $\bar{x} \pm s$）

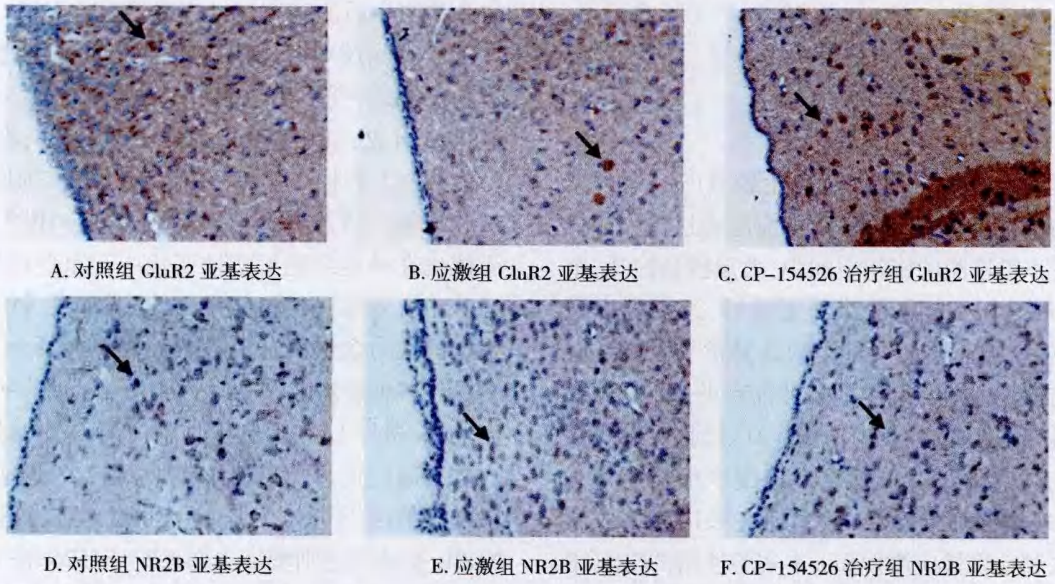
Tab.3 Levels of GC in rat blood serum in each group (μg/L, n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GC浓度
对照组	10	52.61 ± 6.11[a]
应激组	10	194.33 ± 23.30[b]
CP-154526治疗组	10	64.17 ± 19.59[c]
F 值		192.756
P 值		0.000

注：采用 LSD 法两两比较，a.与应激组比较 P=0.000；b.与 CP-154526 治疗组比较 P=0.000；c.与对照组比较 P=0.161

2.4 脑 GluR2、NR2B 亚基表达免疫组化染色结果定量分析

结果见图 1 所示，光镜下(400×)，GluR2 亚基的免疫产物为棕褐色颗粒状，阳性反应主要存在于神经元细胞膜。应激组组大鼠下丘脑 GluR2 亚基表达明显减少，弱阳性。对照组与 CP-154526 治疗组均为明显阳性反应。光镜下(400×) NR2B 亚基的免疫组化阳性的细胞呈现棕褐色，阳性反应也是定位于神经元胞膜。分析比较 GluR2、NR2B 亚基表达的平均光密度，表 4 显示：对照组、应激组、CP-154526 治疗组 GluR2 亚基表达的平均光密度分别为 0.227 ± 0.031、0.079 ± 0.011、0.169 ± 0.020。各组大鼠下丘脑 GluR2 亚基表达差异有统计学意义(F=108.680, P=0.000)；对照组、应激组、CP-154526 治疗组 NR2B 亚基表达的平均光密度分别为 0.159 ± 0.021、0.266 ± 0.054、0.168 ± 0.018。各组大鼠下丘脑 NR2B 亚基表达有统计学意义差别(F=28.264, P=0.000)。应激组大鼠下丘脑 GluR2 亚基平均光密度明显低于对照组，与对照组相比差异均显著(P=0.000)。同时应激组大鼠下丘脑 GluR2 亚



A. 对照组 GluR2 亚基表达　B. 应激组 GluR2 亚基表达　C. CP-154526 治疗组 GluR2 亚基表达

D. 对照组 NR2B 亚基表达　E. 应激组 NR2B 亚基表达　F. CP-154526 治疗组 NR2B 亚基表达

图 1 免疫组化检测大鼠下丘脑 GluR2、NR2B 亚基的表达（400×）

Fig.1 Expression of GluR2, NR2B subunit in hypothalamus observed by immunohistochemical (400×)

基平均光密度亦明显低于 CP-154526 治疗组，与 CP-154526 治疗组相比差异具体统计学意义（P=0.000）；CP-154526 治疗组大鼠下丘脑 GluR2 亚基平均光密度略低于对照组，与对照组相比差异具体统计学意义（P=0.000）；应激组大鼠下丘脑 NR2B 亚基平均光密度明显高于对照组，与对照组相比差异具有统计学意义（P=0.000）。而应激组大鼠下丘脑 NR2B亚基平均光密度也明显高于 CP-154526 治疗组，与 CP-154526治疗组相比差异具体统计学意义（P=0.000）；CP-154526 治疗组大鼠下丘脑 NR2B 亚基平均光密度与对照组比较接近，与对照组相比差异无统计学意义（P=0.615）。

表 4 GluR2、NR2B 亚基平均光密度值比较（n=8，$\bar{x} \pm s$）

Tab.4 Comparison on average optical density value of GluR2, NR2B subunit（n=8，$\bar{x} \pm s$）

组别	GluR2平均光密度	NR2B平均光密度
对照组	0.227 ± 0.031^{a}	0.159 ± 0.021^{d}
应激组	0.079 ± 0.011^{b}	0.266 ± 0.054^{e}
CP-154526治疗组	0.169 ± 0.020^{c}	0.168 ± 0.018^{f}
F值	108.680	28.264
P值	0.000	0.000

注：采用 LSD 法两两比较，a.与应激组比较 P=0.000；b.与 CP-154526 治疗组比较 P=0.000；c.与对照组比较 P=0.000；d.与应激组比较 P=0.000；e.与 CP-154526 治疗组比较 P=0.000；f.与对照组比较 P=0.615

2.5 相关性分析

悬尾实验不动时间与血浆 GC 浓度呈正相关（r=0.721，P=0.006）、与 GluR2 平均光密度呈负相关（r=−0.721，P=0.014）、与 NR2B 平均光密度呈正相关（r=0.589，P=0.153）；强迫游泳不动时间与血浆 GC 浓度呈正相关（r=0.486，P=0.004）、与 GluR2 平均光密度呈负相关（r=−0.812，P=0.012）、与NR2B 平均光密度呈正相关（R=0.868，P=0.000）。

3 讨 论

束缚应激作为一种非损伤性刺激广泛运用于抑郁动物模型制备中。慢性束缚应激通过将大鼠长期束缚在不可逃脱的密闭空间中，大鼠拼命挣扎，企图逃脱，但是仍不能摆脱束缚困境后，逐渐会出现“行为绝望”状态，并诱发行为活动异常、精神消沉，此时动物模型的症状和体征与抑郁症类似。本课题组之前研究证明慢性束缚应激达 21 d 时，大鼠应激相关行为学和体征以及病理生理改变最为明显和稳定，呈现类似抑郁症状，故本研究采用束缚应激 21 d 方法制造慢性应激模型。本实验使用的CRH1R 拮抗剂 CP-154526 在前期研究中证明可改善应激后行为学异常，可抑制 HPA 轴活性增加[7]。

本实验采用悬尾实验和强迫游泳实验对各组大鼠进行行为学检测。其原理是利用小鼠悬尾或则入水后企图逃脱但又无法逃脱，最终放弃挣扎。悬尾实验和强迫游泳实验提供了无可回避的压迫环境，通过记录处于该环境的动物产生绝望的不动状态过程中的一系列参数，量化反映“行为绝望状态”，这种行为绝望模型类似于抑郁症的症状和体征[8-9]。

在强迫游泳和悬尾实验中慢性应激大鼠不动时间增加，指标客观反映长期的应激会导致自发活动性、规避危险能力下降，抑郁、焦虑程度增加，躲避不良环境的能力被损害，行为绝望；模拟了抑郁症患者对外界不良环境的避让行为下降，可以认为束缚应激损害了大鼠特异性的神经规避系统。行为学实验同时也证明了本研究造模成功，可认为经过长时间的束缚，成功建立起了慢性应激模型。同时，实验还可见 CP-154526 治疗组大鼠以上实验数据均明显有别于应激组大鼠，说明 CRH1R 拮抗剂CP-154526 可明显拮抗慢性束缚后的行为绝望状态，增强大鼠规避不良环境的能力。

ELISA 实验提示，应激组大鼠血清 GC 浓度明显高于对照组，表明应激组大鼠 HPA 轴已处于亢进状态。而 CRH1R 拮抗剂 CP-154526 干预后，大鼠血清 GC 浓度则明显低于应激组，与对照组无明显差别。说明 CP-154526 可抑制 HPA 轴高反应性，有效改善应激后的病态神经内分泌反应。

本实验还对各组大鼠谷氨酸受体进行了定量检测。NMDA 受体由 NR1、NR2A-D 及 NR3A-B7 种亚单位组成，其中 NR2B 属于调节亚基，在 NMDA 受体功能上起核心作用，在应激后 HPA 轴反应性增加和抑郁心理改变等方面均有重要作用[10]。AMPA 受体也在神经细胞可塑性变化中起重要作用，其中的 GluR2 亚基是最核心作用，此亚基在 AMPA 受体中里的相对含量决定了 AMPA 受体的活化与失活，当受到各种刺激时，GluR2 表达下调，诱导钙离子内流增加，诱导 LTP，引起下丘脑功能可塑性改变[11]。

本研究通过免疫组织化学方法，发现应激组大鼠与对照组相比，下丘脑 GluR2 亚基表达减少，NR2B 亚基表达则增加。而 CP-154526 治疗组大鼠下丘脑 GluR2 亚基表达则高于对照组，但是低于应激组。同时 CP-154526 治疗组大鼠下丘脑 NR2B 亚

基表达与对照组相比没有差异。可见应激后，下丘脑 NMDA 受体 NR2B 亚基与 AMPA 受体 GluR2 亚基呈相反趋势变化，GluR2 亚基下调，NR2B 亚基上调，按照“GluR2 假说”，会继发引起 Ca^{2+}内流增加，诱导 LTP。而在使用 CRH 受体拮抗剂 CP-154526 进行干预后，能够明显逆转 NR2B 亚基升高与GluR2 下降的趋势，这说明 CRH 受体可能是谷氨酸受体的上游调控点，CP-154526 通过阻断 CRH 受体来抑制谷氨酸后受体亚基改变的，从而抑制下丘脑可塑性改变。

有研究表明，应激后 HPA 轴激活，导致 GC 分泌增多，GC 与脑区 GC 受体结合，导致神经细胞外兴奋性氨基酸主要是谷氨酸含量增高[12]。谷氨酸诱导下丘脑 GluR2 亚基表达减少，NR2B 亚基表达增加，激活细胞膜 NMDA 与 AMPA 受体，促进细胞外钙离子内流，破坏神经元内 Ca^{2+}稳态平衡，造成神经元内 Ca^{2+}超载，胞内高 Ca^{2+}可激活内源性酶，产生大量的 NO 自由基[13]。Zouboulis 等[14]认为，慢性应激后谷氨酸受体激活，诱导 LTP，使 NO 产生增加，NO 继而影响应激后 CRH 分泌。这就是慢性应激后-Glu-NMDA 受体-NO-CRH 通路。同时有研究认为慢性应激后 NMDA 受体过度激活能引发行为绝望样行为表现，而给予 NMDA 受体拮抗剂 MK-801，可明显的缓解应激诱发的异常行为。而 AMPA 受体增加，也可改善异常行为[15]。在本实验中，通过 Pearson 相关分析可见悬尾不动时间和强迫游泳不动时间与血浆 GC 浓度和 NR2B 亚基表达呈正相关，和 GluR2 亚基表达呈负相关。说明慢性应激大鼠下丘脑谷氨酸受体以及血浆 GC 浓度与行为绝望状态有内在关联。血浆 GC 高表达以及谷氨酸受体亚基改变，诱导大鼠出现行为绝望状态。

综上所述，应激状态下血浆 GC 浓度上升和下丘脑谷氨酸受体发生继发变化。NMDA 受体 NR2B 亚基表达和血浆 GC 浓度增加，而 AMPA 受体GluR2 亚基减少，和行为绝望状态相关。而 CP-154526 通过阻断 CRH1R，降低 GC 的分泌，拮抗谷氨酸受体相关改变，最终改善行为绝望状态。但是对于下丘脑谷氨酸受体改变与行为绝望状态的具体关系目前还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Luppens D, Piette C, Radermecker RP, et al. Depression and type 2 diabetes: etiopathogenic analysis of a frequent comorbidity[J]. Rev Med Liege, 2014, 69(11): 611-617.

[2] Herman JP, Flak J, Jankord R. Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus[J]. Prog Brain Res, 2008, 170(8): 353-364.

[3] Kitayama N, Vaccarino V, Kutner M, et al. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta analysis[J]. J Affect Disord, 2005, 88(1): 79-86.

[4] 闫黎敏，安书成，刘 慧. 应激性抑郁样行为发生中海马 5-羟色胺 1A 受体的作用及其对 NMDA 受体和 AMPA 受体的调节[J]. 心理学报，2012，44(10)：1318-1328.

[5] Asero R. Erratum to: In patients with LTP syndrome food-specific IgE show a predictable hierarchical order[J]. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2014, 46(4): 142-146.

[6] Haering SC, Tapken D, Pahl S, et al. Auxiliary subunits: shepherding AMPA receptors to the plasma membrane[J]. Membranes (Basel), 2014, 4(3): 469-490.

[7] 戴若以，张云东，顾小红. 束缚应激大鼠下丘脑 BDNF 和 GAP-43 表达变化与行为学变化的关系[J]. 中华创伤杂志，2015，31(2)：169-172.

[8] Park HJ, Lim EJ, Zhao RJ, et al. Effect of the fragrance inhalation of essential oil from Asarum heterotropoides on depression-like behaviors in mice[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1): 571.

[9] Kanekar S, Bogdanova OV, Olson PR, et al. Hypobaric Hypoxia Induces Depression-like Behavior in Female Sprague-Dawley Rats, but not in Males[J]. High Alt Med Biol, 2015, 16(1): 52-60.

[10] Shipton OA, Paulsen O. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013, 369(1633): 279-281.

[11] Palmer CL, Cotton L, Henley JM. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors[J]. Pharmacol Rev, 2005, 57(2): 253-277.

[12] Abrahám I, Juhász G, Kékesi KA, et al. Corticosterone peak is responsible for tress-induced elevation of glutamate in the hippocampus [J]. Stress, 1998, 2(3): 171-181.

[13] Pang Z, Geddes JW. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin3 -nitroprpionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis[J]. Journal of Neuroscience, 1997, 17(9): 3061-3073.

[14] Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N, et al. Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(10): 7148-7153.

[15] 岳利峰，王 玲，赵 健. 肝郁脾虚证大鼠双侧海马 CA1 区注射 AMPA 后行为的变化及逍遥散的调节作用[J]. 北京中医药大学学报，2012，35(12)：817-821.

（责任编辑：冉明会）