DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.016
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
152 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0152-03

大鼠创伤后应激障碍模型的建立及其海马糖皮质激素受体的变化

王庆松,王正国,朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 建立较理想的创伤后应激障碍(PTSD)动物模型,并初步探讨脑组织糖皮质激素受体(GR)变化规律。方法 采用频率25 Hz、波宽1 ms、串长10 s、串隔7 min、强度100 μA的恒流、单脉冲电流,反复刺激大鼠海马建立PTSD模型,观察实验动物情感行为改变;并利用Western blot法检测脑组织GR表达。结果 通过反复惊厥阈下电刺激海马,成功诱发了实验动物较长时程的明显活动习性改变、警觉水平增高、惊恐行为、环境适应能力下降、躲藏逃避反应等多种PTSD样情感行为障碍;电刺激停止后1周内海马GR表达明显增高。结论 海马惊厥阈下电刺激可基本满足PTSD主要临床表现,而海马结构GR持续性高表达可能直接参与了PTSD持续性精神行为障碍的发生发展过程。

关键词:应激障碍,创伤后;模型;海马;糖皮质激素受体
中图法分类号:R-332;R392.11;R641 文献标识码:A

Establishment of PTSD model in rats and expression of glucocorticoid receptor in the hippocampi

WANG Qing-song, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-fang (Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To establish a relatively ideal animal model of posttraumatic stress disorder (PTSD), and observe the expression of glucocorticoid receptor (GR) in brain tissues of the model. **Methods** The hippocampus of Wistar rat was repeatedly stimulated with single pulse constant pulsating current of 100 μA, 16 Hz in intratrain frequency, 1 ms in pulsating duration, 10 s in train duration, and with interstimulus interval of 7 min, 8 times per day for 5 d. The emotional behaviors of experimental rats were obsemed, and the GR expression was detected with Western blotting. **Results** The experimental rats displayed a long-term significant abnormalities of PTSD-like emotional behaviors, such anxiety-like behariors as substantial changes in behavioral habits, hyperarousal, frightenedly hypersensitive reactions. And the GR expression in the hipocampus was increased remarkably. **Conclusion** The animal model of subconvulsive stimulating to hippocampus fulfills most characteristics in PTSD, and the constantly increased GR expression may play an important role in the long-term persistent neuropsychological sequelae of PTSD.

Key words: posttraumatic stress disorder (PTSD); model; hippocampus; glucocorticoid receptor (GR)

创伤后应激障碍(Posttraumatic stress disorder, PTSD)是对严重应激因素的一种异常精神反应。随着战争、社会暴力事件、重大交通事故和自然灾害等创伤意外的存在,PTSD以其发病率、患病率高,慢性病程,疗效差等特点严重影响临床救治而备受关注[1,2]。我们通过大鼠海马惊厥阈下电刺激,重点观测了实验动物PTSD样情感行为改变与脑组织糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)表达的动态变化规律。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

6~7周龄雄性Wistar大鼠(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)44只,实验起始体重(180±20) g,随机分为3组,海马阈下电刺激组(SE, n=20)、海马电极埋植对照组(EC, n=12)、正常对照组(NC, n=12)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870284);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98M044)

作者简介:王庆松(1966-),男,湖北省钟祥市人,博士,主治医师,主要从事神经精神疾病临床及PTSD、认知功能受损、血管性痴呆等方面的研究。发表论文20余篇,现在第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所临床医学博士后流动站继续工作。电话:(023)68757432

收稿日期:2001-04-19;修回日期:2001-10-10

1.2 模型制备

动物固定于立体定向仪后,按Pllegrino大鼠脑图谱确定海马CA1区双极漆包不锈钢电极(直径0.2 mm,尖距0.1 mm)埋植部位:门齿高于耳杆平面3 mm,前囟后4.5 mm,旁开5.0 mm,硬脑膜下5.5 mm。牙科水泥固定电极,动物恢复一周后开始实验。通过海马后放电(After discharges)及其持续时间测定,确立电刺激参数:波宽1 ms、频率25 Hz、串长10 s、刺激强度100 μA、恒流、单向方波,每天刺激8次,串隔7 min,连续刺激5 d。

1.3 行为学观察

观察最后一次电刺激停止后1 d、1周及1个月时动物情感行为改变。

1.3.1 惊吓反应 观察动物接受反复、短暂(1~2 s)高频金属音刺激后行为习性、自主活动及适应能力的变化。

1.3.2 旷场活动性 将大鼠轻轻放入旷场行为观察箱中央小方格内,观测30 s内动物的活动情况。计分标准:大鼠1/2以上身体从所在方格进入相邻方格计1分;大鼠后肢性站立计1分;二者相加为其所得总分[3]。

1.3.3 拒俘反应性 以动物从未接触过的手套轻抓大鼠,观察其反应。记分标准:0:很容易抓取动物;1:尖叫或回避;2:尖叫并回避;3:逃脱;4:逃脱并尖叫;5:咬或试图撕咬手套;6:主动跃起攻击[3]。

1.4 Western blot检测脑组织GR表达

各组动物分别于电刺激停止后24、48、72 h及1、2周时随

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

机各取 8 只活杀, 取双侧海马、额叶皮层各 100～150 mg, 常规提取并制备膜蛋白, 蛋白定量后 SDS-PAGE 电泳、硝酸纤维素膜电转印, 兔抗大鼠 GR 一抗(Santa Cruz Biotechnology) 1∶1 000、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 1∶1 500 各反应 1 h, 化学发光试剂(Boehringer Mannheim)中反应 1～5 min, X 线胶片曝光、显影、定影。将 X 线胶片置于凝胶扫描成像分析系统(Bio-Rad) 测定目标带单位密度, 以正常对照组动物的单位密度值为标准校正后统计分析。

1.5　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 9.0 软件进行单因素方差分析及各组均数的最小显著差值法(LSD 法)比较。

2　结果

2.1　惊吓反应观察

短暂高频金属音刺激时, 对照组动物出现 1～3 s 的轻微惊吓反射, 重复 3 次以上同样刺激后很快适应; SE 组动物在电刺激停止后 1 个月内, 以同样高频金属音刺激时出现明显的惊吓反应, 表现为全身性惊吓反射、反应幅度增大、持续时间长(5～10 s), 并出现打洞、埋头、趋暗性等多种躲藏、逃避性焦虑样行为, 且对刺激的适应时间明显延长, 反复刺激 6～10 次后仍有较明显惊吓反应。

2.2　情感行为观察

电刺激停止后 1 个月内 SE 组动物旷场活动性较对照组明显减少, 拒俘反应性则显著增强见表 1、2。

表 1　大鼠旷场活动性计分改变

Tab 1　The alterations of rat's activity in open-field

Group	n	Poststimulation		
		1 d	1 week	1 month
SE	17	3.6±1.3 **	5.9±1.7 **	10.4±2.3 *
EC	11	16.3±3.5	17.2±3.3	16.8±3.2
NC	12	17.4±3.2	16.1±3.4	17.5±3.6

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* group NC or EC

表 2　大鼠拒俘反应性计分改变

Tab 2　The alterations of resistance to capture in experimental rats

Group	n	Poststimulation		
		1 d	1 week	1 month
SE	17	3.92±0.73 **	3.74±0.72 **	2.85±0.56 **
EC	11	1.38±0.21	1.36±0.24	1.41±0.27
NC	12	1.33±0.24	1.38±0.24	1.49±0.31

**: $P<0.01$ *vs* group NC or EC

2.3　脑组织 GR 表达变化

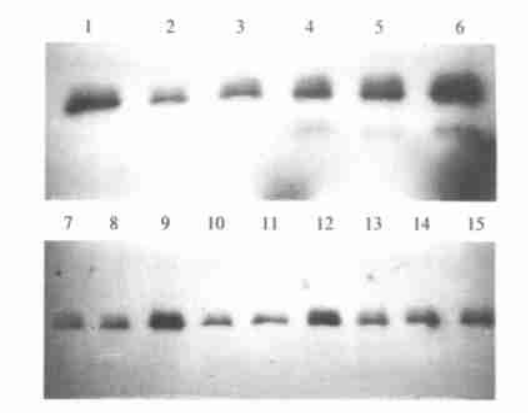
Western blot 结果见图 1, 经图像扫描分析显示电刺激停止后 48 h 至 1 周, SE 组动物海马 GR 表达明显增高, 见表 3, 额叶皮层则无明显改变($P>0.05$)。

表 3　海马 GR 免疫印迹检测结果

Tab 3　The expressions of Glococorticoid receptor in hippocampus

Group	n	Poststimulation				
		24 h	48 h	72 h	1 week	2 week
SE	8	0.98±0.31	1.79±0.57 *	3.74±1.17 **	2.95±0.94 **	1.22±0.39
EC	8	0.87±0.28	1.04±0.33	1.24±0.38	0.95±0.26	1.23±0.35
NC	8	1.00±0.29	1.00±0.27	1.00±0.24	1.00±0.34	1.00±0.31

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* group NC or EC



1, 4, 7, 10, 13: Group NC 24, 48, 72 h and 1, 2 weeks; 2, 5, 8, 11, 14: Group EC 24, 48, 72 h and 1, 2 weeks; 3, 6, 9, 12, 15: Group SE 24, 48, 72 h and 1, 2 weeks

图 1　电刺激停止后 24、48、72 h 及 1、2 周时海马 GR 蛋白质免疫印迹检测结果

Fig 1　GR expressions in hippocampus at 24, 48, 72 h and 1, 2 weeks poststimulation by Western analysis GR expressions at 24 h and 48 h poststimulation respectively

3　讨论

PTSD 临床表现多样, 主要包括创伤经历再体验、情感麻木与回避行为、警觉增高所致易激惹症状三大症候群[4]。但限于其临床研究的特殊性, 及缺少理想动物实验模型及相关研究报道, 目前对其神经生物学致病机制尚不明确[5]。为此, 本研究首先以海马 CA1 区为诱发部位, 通过重复电刺激, 观察是否可诱发与 PTSD 临床表现相似的的情感行为障碍。实验中, 一方面要求所施电刺激既可诱发海马后放电, 以最大限度地引发实验动物情感行为异常; 同时又控制其持续时间在一定限度内, 尽量减少实验中可能出现惊厥行为及其它影响因素。另一方面, 一定数量的电刺激累积对产生明显、持续的情感行为障碍至关重要。因此, 通过对电刺激波宽、频率、串长、强度、串隔, 以及刺激总次数进行相应调整, 最后确立了符合实验要求的电刺激参数, 成功诱发了实验动物明显的、较长时程的活动习性改变、警觉水平增高、惊恐行为、环境适应能力下降、躲藏逃避反应等多种与 PTSD 相似的精神、行为异常表现。

近来研究发现, PTSD 患者存在明显的下丘脑-垂体-肾上腺轴负反馈抑制作用增强和持续性低皮质醇反应, 及一定程度的海马结构、杏仁核、Broca's 区等功能与形态学改变, 推测皮质类固醇激素及其受体在这种应激性中枢神经系统受损中可能有重要意义[6]。但是, 限于缺少相关的实验研究报道, 目前对此尚有争议[7]。为此, 本研究在建立可基本满足 PTSD 临床表现的动物模型基础上, 利用蛋白质免疫印迹技术, 对海马结构 GR 表达进行了动态检测, 以进一步探讨类固醇激素受体在实验动物 PTSD 样情感行为异常中的可能

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

意义。

实验结果显示，与动物情感行为异常基本同步，电刺激停止后1周内海马GR表达明显持续增高，而额叶皮层则无明显变化。GR是皮质类固醇激素作用的一种主要受体；增强GR可促进Ca^{2+}内流，增进5-羟色胺(Serotonin，5-HT)对5-HT_{1A}受体、氨甲酰胆碱对毒蕈碱受体的反应性，且在海马齿状回神经元兴奋性双向调节、细胞凋亡、突触长时程增强(Long-term potentiation，LTP)及学习和记忆形成中均有重要作用[8]。因此，选择性海马结构GR持续性高表达可能直接参与了PTSD持续性情感行为障碍与认知功能受损的发生发展过程；如何进一步探讨相关作用机制与有效干预措施对防治PTSD可能有重要意义。

参考文献：

[1] Kessler R C. Posttraumatic stress disorder: the burden to the individual and to society[J]. J Clin Psychiatry, 2000, 61(suppl 5): 4—12.
[2] 王庆松，王正国，朱佩芳. 创伤后应激障碍及其神经生物学机制[J]. 中华创伤杂志，2001，17(7)：443—445.
[3] Kalynchuk L E, Pinel J P J, Treit D, *et al*. Presistence of the interictal emotionality produced by long—term amygdala kindling in rats[J]. Neuroscience, 1998, 85(4): 1 311—1 319.
[4] Bryant R A, Harvey A G, Guthrie R M, *et al*. A prospective study of psychophysiological arousal, acute stress disorder, and posttraumatic stress disorder[J]. J Abnorm Psychol, 2000, 109(2): 341—344.
[5] Kaufer D, Friedman A, Seidman S, *et al*. Acute stress facilitates long-lasting changes in chrolinergic gene expression[J]. Nature, 1998, 393(6 683): 373—377.
[6] Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders[J]. Arch Gen Psychiatry, 2000, 57(10): 925—935.
[7] Yehuda R. Stress and glucocorticoid[J]. Science, 1997, 275(5 306): 1 662—1 663.
[8] Lupien S J, McEwen B S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies[J]. Brain Res Rev, 1997, 24(1): 1—27.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)02-0154-01

手动式多叶准直器临床应用53例报告

A 53-case report of clinical application of manual multi-leaf collimator

王 希，肖 红，庞学利，谭崇富，曾 勇 （第三军医大学附属西南医院肿瘤科，重庆 400038）

近来，随着适形照射技术的开展，多叶准直器(Multi Leaf Collimator，MLC)的使用日趋普及。现将我院临床使用手动式多叶准直器(Manual MLC)的体会报告如下。

1 临床资料

我院自1998年以来，使用MLC适形照射技术治疗各类肿瘤病人53例。其中头颈部肿瘤29例，胸腔肿瘤18例，腹腔肿瘤6例，所有病人或者采用立体定向适形放疗技术或者应用MLC的等中心适形放疗技术治疗。

2 治疗方法

2.1 准直器系统

中科院大恒公司手动式多叶准直器系统，主要参数：34对叶片，叶片厚度3 mm，高度70 mm，长度90 mm，钨合金材料制作，漏射率< 1%，最大开启范围80 mm× 85 mm，等中心处最大射野140 mm× 160 mm。

2.2 治疗设备

Varian Clinic 2300 C/D型直线加速器治疗机，6 MV-X线。

2.3 立体定向适形放疗

治疗计划系统为中科院大恒公司Star-2000三维治疗计划系统。固定和定位装置包括头部无创分次治疗头环和体部定位框架及真空成形垫。

患者治疗前，根据病灶部位选择头部或体部定位系统进行CT扫描定位，利用BEV(Beam's Eye View)方法确定病灶非共面多个固定野的轮廓，并以此确定照射野的角度和MLC叶片相应的开启形状。

2.4 等中心适形放疗

对于鼻咽癌患者，使用专用头枕和热塑成形面膜固定头部，在模拟定位机下确定病灶等中心和靶区，并勾画出不规则面颈联合野的轮廓，确定MLC的适形野。

2.5 模板的制作

根据治疗计划绘制出的适形野的形状和大小制作有机玻璃模板。

3 讨论

3.1 MLC支持的适形放疗技术包含了两方面的涵义

一是利用BEV方法设计的不规则照射野与病灶靶区投影形状一致，最大限度减少了邻近正常组织的受量，保护重要器官，减少并发症。二是利用非共面多个固定野照射，使靶区剂量高且分布更均匀[1]。

3.2 MLC与加速器准直器配合使用的意义

对于大部分不同形状和大小的靶区，由于通常只有部分叶片处于有效射野的范围内，而其余的处于其范围之外，为了避免相邻叶片之间微小缝隙处可能的漏射线，应调整常规准直器，以规定一个相对有效的最小外接矩形野，进一步减少射线泄漏。

（下转163页）

作者简介：王 希(1964—)，男，河南省社旗县人，主管技师，发表论文5篇。
电话：(023)65321708

收稿日期：2001-09-21；修回日期：2001-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net