

早期丰富环境对大鼠远期行为发育及血清皮质酮的影响

马良¹ 陈燕惠¹ 韦立新²

(福建医科大学附属协和医院,1. 儿科;2. 检验科,福建 福州 350001)

[摘要] **目的** 探讨早期丰富环境对大鼠行为发育及血清皮质酮的影响。**方法** 将45只新生大鼠随机分为丰富环境组、空白对照组和隔离环境组,于大鼠出生后31 d分别采用开场实验、Lat 迷宫测验评价大鼠焦虑、烦躁等行为;采用放射免疫学方法测定大鼠血清皮质酮水平。**结果** 丰富环境组血清皮质酮水平(8 ± 3 ng/mL)较空白对照组(11 ± 4 ng/mL)及隔离环境组(22 ± 4 ng/mL)明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。开场实验结果显示,丰富环境组大鼠穿越格子数、直立次数、理毛次数明显少于空白对照组及隔离环境组大鼠($P < 0.05$)。Lat 迷宫试验结果显示,丰富环境组大鼠穿越角落数、直立次数、斜搭在墙上的频率明显少于空白对照组与隔离环境组大鼠($P < 0.05$)。**结论** 早期丰富环境使大鼠能保持较低的皮质酮水平,减缓焦虑、烦躁等行为,对促进脑发育有重要意义。
[中国当代儿科杂志,2011,13(7):586-589]

[关键词] 早期环境;皮质酮;行为发育;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)07-0586-04

Effects of early enriched environment on long-term behavior development and serum corticosterone level in rats

MA Liang, CHEN Yan-Hui, WEI Li-Xin. Department of Pediatrics, Xiehe Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China (Chen Y-H, Email: yanhui_0655@126.com)

Abstract: Objective To study the effects of early enriched environment on behavioral development and serum corticosterone level in rats. **Methods** Forty-five neonatal rats were randomly assigned into three groups: blank control, enriched environment and isolated environment. The open-field environment test and the Lat maze test were performed to assess anxiety/irritability-related behaviors of the rats on postnatal day 31. The level of serum corticosterone was measured by radioimmunity assay. **Results** The level of serum corticosterone in the enriched environment group (8 ± 3 ng/mL) was significantly lower than the blank control (11 ± 4 ng/mL) and the isolated groups (22 ± 4 ng/mL) ($P < 0.01$). The open-field environment test showed that the numbers of passing panels, keeping an erect posture and grooming were less than those in the blank control and the isolated groups ($P < 0.05$). According to the results of the Lat maze test, the frequencies of running across the corner, keeping an erect posture and leaning against the wall in the enriched environment group were less than those in the blank control and the isolated groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Early enriched environment can decrease serum corticosterone level and thus alleviates anxiety and irritability in rats. It may play an important role in the improvement of brain development. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (7):586-589]

Key words: Early environment; Corticosterone; Behavior development; Rats

早期丰富化环境(early enriched environment)对未成熟脑发育和远期行为影响的研究已有较多的报道。近年来研究表明 EEE 对脑发育和脑功能有促进作用,但其机制仍未明确。随着对“免疫-神经-内分泌网络”的不断深入研究,下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴在发育行为中的调节作用受到了广泛的关注。HPA 轴是迄今为止最重要的内分泌轴。在应激心理神经内分泌反应中,肾上腺糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)被认为是观察行为活动(如警觉、注意、学习、记忆、自发活动、情绪等)的一个客观变化指标^[1],而糖皮质激素水平受 HPA 轴活动调节^[2]。本研究拟通过测定在不同饲养环境下大鼠血清皮质酮水平,探讨早期丰富化环境对其行为发育影响以及相关 HPA 轴可能的调控机制。

[收稿日期]2010-10-14;[修回日期]2010-12-27
[作者简介]马良,男,硕士研究生。
[通信作者]陈燕惠,教授。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

Sprague-Dawley (SD) 孕鼠 14 只, 体重 300 ~ 350 g (清洁级, 由上海史莱克实验动物中心提供)。新生雄性 SD 大鼠随机分为丰富环境组、隔离环境组和空白对照组, 每组各 15 只。实验大鼠除接受环境刺激外, 均与其母鼠和同窝大鼠同笼饲养至断乳。动物饲养环境室温控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度 56% 左右, 12 h 光照刺激, 12 h 间断照明, 大鼠自由摄食、饮水, 定期换笼饲养^[3]。

1.1.1 丰富环境组 丰富环境参照文献^[4]设计。丰富环境为一大笼 ($42\text{ cm} \times 26\text{ cm} \times 21\text{ cm}$) 内放置不同颜色及形状的物体, 包括管道、秋千、斜坡和玩具等, 每周定期更换笼中物体 2 次。丰富环境组大鼠于生后第 15 天 (P15) 开始, 每日 9:00 ~ 12:00 am 从与母鼠同笼的笼子中移到大笼中 3 h; 自断乳起 (P21) 大鼠全天放入丰富环境中, 持续至第 28 天。

1.1.2 隔离环境组 参照文献^[5]设计。隔离环境为笼内不放置任何物体的单调笼。P15 ~ P21 将大鼠从与母鼠同笼的笼子中取出, 分别独自置于隔离环境 3 h (9:00 ~ 12:00 am), 自 P21 断奶起大鼠全天放入隔离环境中, 持续至第 28 天。

1.1.3 空白对照组 大鼠置于原环境下饲养, 即 P15 ~ P21 每天 9:00 ~ 12:00 am 将母鼠移出放入普通饲养笼 3 h。自 P21 断奶起将母鼠全天移出, 被试大鼠与其他同窝生大鼠原笼饲养, 持续至第 28 天。

1.2 方法

1.2.1 开场实验 开场实验参照文献^[6]。实验装置为一个 $40\text{ cm} \times 60\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ 的黑木箱, 箱子底部画有 $20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ 方块 9 个。实验时将 P31 大鼠轻轻放入中央格子, 观察动物 5 min 内的活动情况, 记录大鼠穿越的格子数、直立次数、理毛次数, 以及粪便数。

1.2.2 Lat 迷宫试验 参照文献^[6]进行。实验装置为一个 $40\text{ cm} \times 60\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ 的黑木箱, 中间放置一个 $30\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ 的透明有机玻璃箱, 从而在内箱壁与外箱内壁之间产生 $15\text{ cm} \times 60\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ 的通道, 在本笼上方 60 cm 处安装一只 4 瓦冷光源。实验开始时将 P31 大鼠轻轻放入角落, 观察大鼠 30 min 穿越角落的频数、直立和斜搭在墙上的频率。

1.2.3 血清皮质酮水平检测 P32 大鼠于 8:00 am, 经眼眶采血 0.5 mL 置离心管内, 室温下离心 10 min (4000 r/min), 取血清 -70°C 保存。采用放射免疫

分析法 (IMK484 试剂盒, 中国原子能科学研究院同位素研究所) 测定血清皮质酮水平。标本处理和检测严格按照说明书进行。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间均数采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清皮质酮水平比较

由图 1 可见, 丰富环境组血清皮质酮水平 ($8 \pm 3\text{ ng/mL}$) 较空白对照组 ($11 \pm 4\text{ ng/mL}$) 及隔离环境组 ($22 \pm 4\text{ ng/mL}$) 明显降低 ($F = 52.34, P < 0.001$); 与空白对照组相比, 隔离环境组大鼠血清皮质酮水平明显增高 ($t = 10.38, P < 0.05$)。

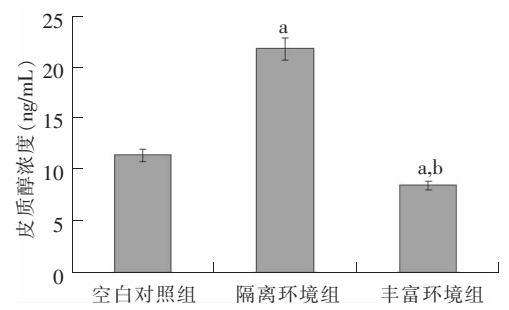


图 1 各组大鼠皮质醇浓度 a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与隔离环境组比较, $P < 0.01$

2.2 各组大鼠开场实验结果比较

由图 2 可见, 丰富环境组大鼠穿越格子数、直立次数、理毛次数与隔离环境组和空白对照组比较明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 隔离环境组大鼠穿越格子数、直立次数、理毛次数与空白对照组比较明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各组大鼠排便个数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

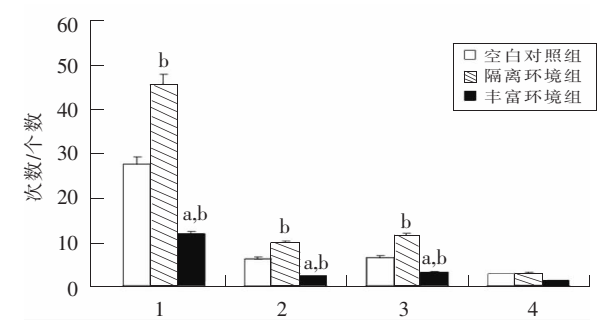


图 2 各组大鼠开场实验结果 1: 穿越格子数; 2: 直立次数; 3: 理毛次数; 4: 粪便个数。a: 与隔离环境组比较, $P < 0.05$; b: 与空白对照组比较, $P < 0.05$

2.3 各组大鼠 Lat 迷宫结果比较

由图3可见,Lat 迷宫试验中,丰富环境组大鼠穿越角落个数、直立次数、斜搭在墙上的频率明显减少,与隔离环境组和空白对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);空白对照组大鼠上述指标也明显少于隔离环境组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

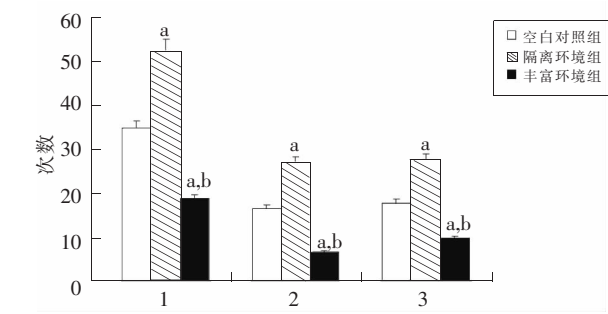


图3 各组大鼠 Lat 迷宫试验结果 1:穿越角落个数; 2:直立次数; 3:斜搭次数。a:与空白对照组比较, $P<0.05$; b:与隔离环境组比较, $P<0.05$

3 讨论

研究表明,早期丰富环境对动物和儿童远期学习记忆、性格特征、情绪能力有积极影响。早期丰富环境可促进新生鼠学习记忆,改善宫内缺血缺氧性脑损伤大鼠脑功能^[7],并认为早期丰富环境促进脑发育和改善脑功能的作用与其增加海马和额叶神经元神经生长相关蛋白的表达、减少神经元凋亡、提高脑组织内源性神经生长因子水平、促进神经纤维髓鞘的发育等有关^[8-9]。以早期丰富环境为主的早期教育与干预对健康婴儿、精神发育迟滞和早产婴幼儿的智能发展也有显著的促进作用^[10-11]。但关于早期丰富环境对脑发育和远期行为影响的具体机制仍未完全明了。

在应激心理神经内分泌反应中,GCs 被认为是观察认知活动的一个客观变化指标。正常状态下,HPA 轴在应激源的作用下,下丘脑释放的促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)增加,刺激垂体前叶促肾上腺皮质激素(ACTH)释放,进而诱导肾上腺皮质合成并释放 GCs 增加,参与一系列的行为反应,如警觉、注意、学习、记忆等,并对自发活动、情绪等具有显著的影响^[1]。

开场实验和 Lat 迷宫测验常被用于评价大鼠焦虑、冲动、激惹等行为^[6],本研究结果显示丰富环境组大鼠在 P31 开场实验中穿越格子数、直立次数、理

毛次数,以及 Lat 迷宫测验中穿越角落个数、直立次数、斜搭在墙上的频率,均少于空白对照组,而空白对照组大鼠穿越格子数、直立次数、理毛次数则少于隔离环境组。提示早期丰富环境能改善大鼠远期焦虑、烦躁等行为,而隔离环境则加剧大鼠焦虑、冲动、多动等行为。

本研究还发现,早期丰富环境对脑发育和远期行为的影响与血清皮质酮水平密切相关,丰富环境组大鼠血清皮质酮含量低于空白对照组大鼠,而空白对照组大鼠血清皮质酮含量低于隔离环境组大鼠。血清皮质酮水平与 HPA 轴的调节密切相关,其机制不仅涉及对 HPA 轴的负反馈作用,还涉及与 HPA 轴调节密切相关的海马组织。研究表明,在海马中有两种类固醇受体参与调节 HPA 轴的负反馈调节。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptors, GR)是皮质酮 II 型受体,除参与 HPA 轴昼夜基本节律调节外,还参与应激时皮质酮的负反馈调节;盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptors, MR)是皮质酮 I 型受体,在海马中与 GR 同时参与调节皮质酮昼夜变化的基础水平^[4]。海马 MR 和 GR 的变化能调节行为和情绪变化,在情绪反应中 MR 和 GR 具有重要的媒介效应,这些受体可调节与记忆、行为反应、害怕和恐惧相关的系统^[12]。高浓度皮质酮可与海马区的皮质酮受体结合,导致海马区细胞长期处于兴奋性神经毒性环境中,可产生一系列结构和功能的损害,如海马神经元数量减少,GR 表达较少和焦虑、烦躁等行为^[13]。本研究也发现隔离环境干预后,大鼠血清皮质酮水平增高,同时在开场实验和 Lat 迷宫测验中大鼠的焦虑、冲动、多动等行为明显增加;相反,早期安全、丰富的环境使大鼠则能保持较低的皮质酮水平,同时减轻了大鼠在行为测验中的焦虑、烦躁等行为。提示血清皮质酮水平对大鼠脑发育和远期行为有重要影响。其机制可能涉及低浓度皮质酮与海马区的皮质酮受体结合对此区的神经元及 GR、MR 起到保护作用^[12-13]。

对早期环境与 HPA 轴功能影响的进一步研究不仅可以丰富情绪神经生物学理论,而且为幼儿早期教育和心理干预提供理论指导,为行为发育障碍的诊断和治疗提供生化以及分子生物学基础。

[参 考 文 献]

- [1] Biondi M, Picardi A. Psychological stress and neuroendocrine function in humans: the last two decades of research[J]. Psychother Psychosom, 1999, 68(3): 114-150.
- [2] Bremner JD. Hypotheses and controversies related to effects of

stress on the hippocampus: an argument for stress-induced damage to the hippocampus in patients with posttraumatic stress disorder[J]. *Hippocampus*, 2001, 11(2): 75-81.

[3] Klein SL, Lambert KG, Durr D, Schaefer T, Waring RE. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats[J]. *Physiol Behav*, 1994, 56(2): 291-297.

[4] Fernández V, Adaro L, Sanhueza-Tsutsumi M, Inzunza O, Bravo H. Early-life polysensorial stimulation and nutrition: Topographic levels of susceptibility in the rats visual cortex[J]. *Biol Neonate*, 1997, 71(4): 265-276.

[5] Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation[J]. *Neurosci Res*, 2007, 58(1): 32-39.

[6] 池霞,郭锡熔,陈荣华,费莉,郭梅,潘晓琴. 注意缺陷障碍动物模型的行为学特征检测[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(38): 68-70.

[7] 刘玲, 陈燕惠, 陈达光. 早期干预对宫内缺氧缺血大鼠脑电波及存活神经元数目的影响[J]. *中华妇幼临床医学杂志*, 2007, 3(2): 91-93.

[8] 陈燕惠,刘玲,陈敏榕,陈达光. 早期干预对新生鼠脑神经生长相关蛋白表达及细胞凋亡的影响[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(14): 1083-1084.

[9] Sale A, Putignano E, Cancedda L, Landi S, Cirulli F, Berardi N, et al. Enriched environment and acceleration of visual system development[J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(5): 649-660.

[10] 陈达光,陈燕惠,张镜源,胡君,林秋君,林新挺,等. 健康婴幼儿早期教育的效果及影响因素[J]. *中国心理卫生杂志*, 2004, 18(12): 827-829.

[11] 陈达光,张镜源,陈燕惠,陈景云,陈珊. 早期干预对早产儿智能影响的研究[J]. *中国心理卫生杂志*, 2001, 15(1): 55-57.

[12] de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1993, 13(4): 433-455.

[13] McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function[J]. *Biol Psychiatry*, 2000, 48(8): 721-731.

(本文编辑:徐福兰)

· 消息 ·

2011 年新生儿治疗矛盾与对策学习班通知

广州市医学会新生儿科分会、广州市妇女儿童医疗中心(广州市儿童医院)和广州市花都区胡忠医院拟于 2011 年 8 月 17~21 日在广州市花都联合举办新生儿治疗矛盾与对策学习班,为期 4 天。本项目系国家级继续教育项目(2011-06-03-048),学习结束授予 I 类学分 10 分。

本项目主要探讨新生儿常见病和危重症治疗中的各种矛盾,从矛盾的认定,矛盾的机制和处理等方面阐明疾病治疗的合理性和全局性,从而更好地进行治疗,避免医源性损伤。将邀请复旦大学儿科医院、上海交通大学新华医院/附属儿童医院、浙江大学附属儿童医院、中南大学湘雅医院、中山大学附一院/附六院、暨南大学医学院附一院、南方医科大学、广州医学院、广州市妇女儿童医疗中心(广州市儿童医院)等单位的专家、教授授课。

报名办法:学费(含资料费)800 元,食宿统一安排,费用自理。有意参加者请来信、电话或电子邮件联系,并注明联系方式以便发送第二轮通知。主办方联系地址:(1)广州市人民中路 318 号 广州市儿童医院新生儿科,邮编 510120;联系电话:020-81330578;13928737378(联系人:周伟,E-mail:zhouwei_pu002@163.com)(2)广州市花都区新华街工业大道 17 号 广州市花都区妇幼保健院(胡忠医院产科院区)新生儿科,邮编 510800;联系电话:13926263850(联系人:瞿柳红,E-mail:quliuhong@126.com)。亦可从广州市妇女儿童医疗中心网站查询和下载相关资料。