

运动通过下丘脑室旁核 CRH 神经元改善慢性束缚压力应激诱导的焦虑样行为*

陈 静^{1,2)}**,*** 陈聪聪²⁾** 张凯娜²⁾ 赖昱霖³⁾ 邹 杨²⁾

⁽¹⁾ 首都医科大学宣武医院神经外科, 中国国际神经科学研究所, 北京 100053;

⁽²⁾ 北京体育大学运动人体科学学院, 国家体育总局运动应激适应重点实验室, 北京 100084;

⁽³⁾ 北京体育大学中国排球运动学院, 北京 100084)

摘要 目的 探讨下丘脑室旁核 (paraventricular nucleus, PVN) 促肾上腺皮质激素释放素 (corticotropin releasing hormone, CRH) 神经元在慢性束缚压力应激 (chronic restraint stress, CRS) 诱导焦虑样行为中的作用, 以及运动干预是否通过 PVN CRH 神经元缓解慢性束缚压力应激诱导的焦虑样行为。**方法** 20 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 随机分为空白对照 (control, Ctrl) 组和 CRS 组, 并通过旷场 (open field test, OFT) 和高架十字迷宫 (elevated plus maze test, EPM) 范式, 评估其焦虑样行为, 并对慢性束缚压力应激后的小鼠摄食量进行统计。通过免疫荧光染色的方法观察 PVN 脑区 c-Fos 的表达情况, 以及与 CRH 神经元的共标情况。利用化学遗传学激活 PVN CRH 神经元, 检测其焦虑情况。通过 8 周跑台干预 (10~16 m/min, 60 min/d, 6 d/周), 观察其对慢性束缚压力应激诱导的焦虑样行为的改善作用。最后, 探讨 PVN CRH 神经元在运动改善焦虑样行为中的作用机制。**结果** 与 Ctrl 组相比, CRS 组小鼠出现明显的焦虑样行为, 在旷场中间区域的时间减少 ($P<0.001$), 在高架十字迷宫的开臂时间减少 ($P<0.001$), 并且出现食欲下降的现象 ($P<0.05$); 与 Ctrl 组相比, CRS 组小鼠能够促进 PVN 脑区 c-Fos 的表达 ($P<0.001$), 并且这些 c-Fos 信号与 CRH 神经元有大量共标 ($P<0.001$); 利用化学遗传学直接激活 PVN CRH 神经元, 小鼠出现焦虑样行为 ($P<0.05$), 并且出现抑制摄食的现象; 运动干预可以缓解 CRS 诱导的焦虑样行为 ($P<0.001$), 并缓解摄食抑制现象 ($P<0.05$); 运动干预可以抑制由 CRS 诱导的 PVN CRH 神经元活性增强 ($P<0.001$), 并且消融 PVN CRH 神经元可缓解 CRS 诱导产生的焦虑样行为。**结论** 慢性束缚压力应激通过激活 PVN CRH 神经元, 诱导小鼠产生焦虑样行为和食欲下降的现象; 8 周运动干预可能通过抑制 PVN CRH 神经元缓解慢性束缚压力应激诱导的焦虑样行为; CRH PVN 神经元损毁, 慢性束缚压力所诱导的焦虑样行为得到改善。这一研究结果揭示了运动缓解压力诱导的焦虑样行为的潜在神经机制, 为治疗焦虑等精神疾病提供了新的思路和理论基础。

关键词 慢性束缚压力, 焦虑样行为, PVN CRH 神经元, 运动

中图分类号 Q42, R87

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0241

CSTR: 32369.14.pibb.20240241

随着社会的飞速发展, 越来越多的人处于高压力的状态, 并引发多种心理问题和精神疾病, 如焦虑 (anxiety) 等, 严重影响身心健康^[1-2]。全球大概有 25% 的人存在焦虑问题^[3]。在中国, 焦虑症 (anxiety disorder) 已经成为普遍存在的精神障碍^[4]。《中国居民营养与慢性病状况报告 (2020)》显示, 中国抑郁症的患病率达到 2.1%, 焦虑障碍的患病率是 4.98%, 两者的患病率总和接近 7%。研究显示, 压力是导致焦虑情绪的重要因素^[5-6]。许多研究试图解析压力诱导精神障碍的神

经机制以及可能的作用靶点^[7]。前人的研究显示, 大脑的多个脑区参与压力诱导的焦虑行为, 包括纹状体、丘脑、杏仁核和下丘脑等^[8-10]。促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin-releasing hormone,

* 国家自然科学基金 (32100821) 和中央高校基本科研业务经费专项 (2021QN030) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 13241200588, E-mail: zhendehenhaojiya@126.com;

chenjing2020@bsu.edu.cn

收稿日期: 2024-06-03, 接受日期: 2024-09-05

CRH) 神经元广泛表达于大脑中, 尤其是下丘脑室旁核 (paraventricular nucleus of the hypothalamus, PVN) 脑区, 在压力应激过程中出现持续性亢进现象^[11-13]。PVN CRH 神经元和下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 在压力作用下促进激素的释放, 协调机体行为^[13-14]。慢性束缚压力是情绪和精神相关疾病的危险因素, 其是否通过影响 PVN CRH 神经元调控激素激素, 影响行为, 并不清楚。

临床针对焦虑等精神障碍疾病的治疗药物治疗有限, 并容易产生多种副作用。而运动被认为可以有效改善压力诱导的焦虑样行为^[15-17]。虽然许多人体研究已经证实了多种运动类型均具有抗焦虑的作用, 但是大脑如何调控这一过程的神经机制还有待探讨^[18-19]。关于运动改善焦虑的分子机制已经有一些研究进展。例如, 最近研究显示, 运动后肝脏代谢产物通过增强脑内突触相关转录物的 RNA 甲基化, 改善前额叶皮质的突触活动, 进而改善压力应激导致的焦虑障碍^[20]。这一结果明确了肝脏-脑轴在运动抗焦虑中发挥关键作用。而专注于脑内的研究显示, 运动通过激活基底外侧杏仁核 (basolateral amygdala, BLA) 脑区的 5-羟色胺 2A 受体 (5-hydroxytryptamine 2A receptor, 5-HT_{2A}R), 进而抑制腺苷 A_{2A} 受体 (adenosine A_{2A} receptor, A_{2A}R) 发挥抗焦虑的作用^[21]。此外, 一些研究认为, 运动可以影响 HPA 轴, 并调控皮质醇的分泌^[15, 22-24], 而且 HPA 轴能够响应压力引起的食欲和能量代谢的变化^[14], 然而运动是否通过 PVN CRH 神经元改善压力诱导的焦虑行为和食欲变化还有待研究。

基于此, 本研究旨在确定慢性束缚压力对于焦虑行为的影响, 以及参与的神经元类型, 其次选择跑台运动的干预方式, 观察运动对慢性束缚压力造成的焦虑行为的影响和对食欲的改善, 以及神经调控机制, 探究运动改善焦虑行为的神经机制, 以期作为运动预防和改善焦虑样行为提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验小鼠

本实验使用 8~16 周龄 C57BL/6J 健康雄性小鼠, 动物的饲养环境温度 22~25℃, 湿度适宜, 避免强光和噪音, 12 h 光照/12 h 黑暗 (照明时间为 7:00~19:00) 的昼夜节律, 自由进食和饮水。每笼小鼠 4~5 只, 需要进行行为学测试的小鼠提前 1 周

进行单笼饲养。实验中使用的 CRH-Cre 小鼠 (JAX: 012704)、Ai14 小鼠 (JAX: 007908) 引进于 Jackson Lab。通过 CRH-Cre 小鼠与 Ai14 小鼠杂交得到 CRH: Ai14 小鼠。所有动物实验均经北京体育大学动物福利伦理委员会批准 (动物伦理编号: 2021086A)。

1.2 慢性束缚压力应激模型 (chronic restraint model, CRS)

将小鼠放置于塑料圆锥形束缚袋中 (束缚袋的头部剪开小孔用于通风), 用绳索束缚尾端, 确保小鼠无法逃离。将小鼠放置于与饲养环境不同的独立空间, 给予小鼠 1 h/次的束缚 (19:00~20:00, ZT1200-1300), 束缚结束后, 小鼠放回原来的笼子, 并恢复食物和水的供给, 连续进行 2 周的束缚。

1.3 行为测试

1.3.1 旷场实验 (open field test, OFT)

旷场实验是经典的测试焦虑的实验之一。旷场实验箱是由亚克力板制作而成的无盖箱体, 规格为 50 cm×50 cm×30 cm (长×宽×高), 测试箱分为中央区域 (25 cm×25 cm) 和外周区域 (除去中央区域剩余的部分)。每只小鼠在正式实验开始前将被放置在旷场中央区域, 让其在旷场中自由探索 5 min 后进行正式记录。两次测试之前, 利用 75% 乙醇彻底清洁箱体, 去除小鼠残留气味, 并等待乙醇完全挥发后, 进行下一只小鼠的测试。整个测试过程均由摄像头进行录制, 数据分析由基于 MATLAB 编写的程序完成。

1.3.2 高架十字迷宫实验 (elevated plus maze, EPM)

高架十字迷宫是由亚克力板制作而成的, 包括两个开臂 (25 cm×5 cm×0.5 cm)、两个闭臂 (25 cm×5 cm×30 cm) 和 1 个中间区域 (5 cm×5 cm)。4 个臂之间两两相对 (开臂对开臂、闭臂对闭臂) 连接在中心区域上形成一个“+”字形。整个十字迷宫离地面至少 40 cm。每只小鼠在正式实验开始前都将被放置在高架十字迷宫中间区域, 并确保小鼠头部朝向开臂。两次测试之前, 利用 75% 乙醇彻底清洁箱体, 去除小鼠残留气味, 并等待乙醇完全挥发后, 进行下一只小鼠的测试。整个测试过程均由摄像头进行录制, 数据分析由基于 MATLAB 编写的程序完成。

1.4 免疫荧光染色

小鼠通过 1.25% 三溴乙醇 (avertin, 240 mg/kg,

i.p.) 麻醉后, 先后利用0.9%生理盐水和4%多聚甲醛(4%PFA, PBS配制)进行灌流, 直至小鼠僵直, 后进行取脑。鼠脑浸泡在4%PFA中, 并放置于4°C固定过夜, 后利用30%蔗糖溶液浸泡脱水。完全沉降后的鼠脑, 利用冰冻切片机进行冠状切片, 切片厚度为30~50 μm 。脑片放置于6孔板中进行漂片染色。首先利用1×PBS漂洗3次, 然后利用3%~5% BSA (PBST配制) 进行封闭和打孔1~2 h, 进而将脑片浸泡于一抗c-Fos抗体中(1: 1 000, Cat#2250, Cell Signaling Technology)放置于4°C过夜孵育。第2天, 利用1×PBST漂洗3次后, 将脑片浸泡在二抗Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit (1: 1 000, Cat#111-165-008, Jackson ImmunoResearch)室温孵育2~4 h, 用1×PBS漂洗3次, 最后贴片、自然晾干、封片。利用VS200 (Olympus) 全自动玻片扫描仪和LSM800 (Zeiss) 共聚焦显微镜对经过病毒表达和免疫荧光染色的脑片进行观察。

1.5 立体定向手术和腺相关病毒(AAV)注射

利用1.25%的三溴乙醇溶液对小鼠进行麻醉, 并将小鼠固定在立体定位仪(RWD)上, 暴露颅骨, 根据小鼠脑立体定位图谱钻颅, 并利用显微注射泵(Micro4-Nanolitter2000, WPI)注射病毒, 注射速度40 nl/min。

对于化学遗传学实验, 将AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry-WPRE-pA病毒(Cat#S0192-9, Taitool, 2×10^{12} V.G./ml, 200 nl/侧)注射到Cre小鼠或对照小鼠的双侧PVN脑区(PVN坐标AP/ML/DV: $-0.85 \pm 0.20/-4.85$)。叠氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO)的浓度为1 mg/kg。对于神经元消融实验, 将AAV2/9-CAG-DIO-taCaspase3-TEVp-WPRE-pA (Cat#S0236-9, Taitool, 2×10^{12} V.G./ml, 200 nl/侧)注射到Cre小鼠或对照小鼠的双侧PVN脑区。

1.6 化学遗传学技术

将G蛋白偶联受体进行改造, 修改后的受体可以通过特殊化合物进行激活或抑制, 这种受体被称为“只由特定药物激活的受体”(designer receptor exclusively activated by designer drugs, DREADDs)。DREADDs只接受外源性配体的信号, 并激活对应的GPCR信号通路, 进而引发细胞不同的兴奋性变化。这一功能可以应用于神经细胞, 其引起钙离子通道、钠离子通道的打开或关闭, 进而诱发神经细胞膜电位的变化。对于带有

Cre基因的小鼠, 可直接利用携带DREADDs转基因和重组DIO的AAV载体注入特定脑区, 再通过腹腔注射CNO可以激活DREADDs。本实验主要应用Gq-DREADD, 即hM3Dq, 利用CNO诱导hM3Dq, 可以使神经元去极化, 加强神经元的兴奋性^[25]。

1.7 运动训练方案

参照Yan等^[20, 26]提出的方案, 小鼠进行为期8周的运动干预, 跑台坡度0°, 采用中等强度的跑台运动, 运动速度为10~16 m/min, 60 min/次(20:00~21:00, ZT1300-1400), 连续运动5 d/周。对照组小鼠放置于跑台上, 不进行运动训练。

1.8 统计学分析

本实验使用Prism 9 (GraphPad) 软件进行统计学分析。两组数据的比较采用了独立样本t检验或two-way ANOVA方差分析, 所有数据均显示为平均±标准误(mean±SEM), * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 和*** $P < 0.001$ 表示差异具有统计学意义, n.s. (no significance)表示没有显著性差异。

2 结 果

2.1 束缚压力应激对焦虑行为和食欲的影响

利用束缚袋对小鼠进行束缚(图1a)。本研究主要利用旷场实验和高架十字迷宫来记录小鼠的活动轨迹, 衡量小鼠的焦虑样行为。经过连续14 d束缚应激(chronic restraint stress, CRS)(60 min/d), 观察小鼠的行为。在旷场实验中, 经过CRS与Ctrl组小鼠相比, 进入中间区域的时间百分比明显减少($P < 0.001$)(图1b, c), 但CRS和Ctrl组小鼠在旷场实验中运动的总距离没有显著性差异(图1d)。在高架十字迷宫实验中, 经过长期束缚压力应激与对照组小鼠相比, 进入开臂的时间百分比和进入开臂的次数明显减少($P < 0.001$)(图1e~g)。此外, 进食情况是反映压力大小的指标之一。因此, 对长期束缚应激的小鼠进食摄食量的统计, 小鼠束缚后1 h和2 h的累计摄食量, 明显比对照组少($P < 0.05$)(图1h)。以上结果表明, 慢性束缚压力诱导小鼠产生焦虑样行为, 并抑制食欲。

2.2 慢性束缚压力激活PVN CRH神经元

为确定参与长期束缚压力应激的神经元类型, 本研究利用免疫荧光染色技术检测c-Fos的表达变化。利用CRH-Cre小鼠与Ai14小鼠进行交配, 获得CRH-Cre: Ai14小鼠, 该小鼠脑内CRH神经元同

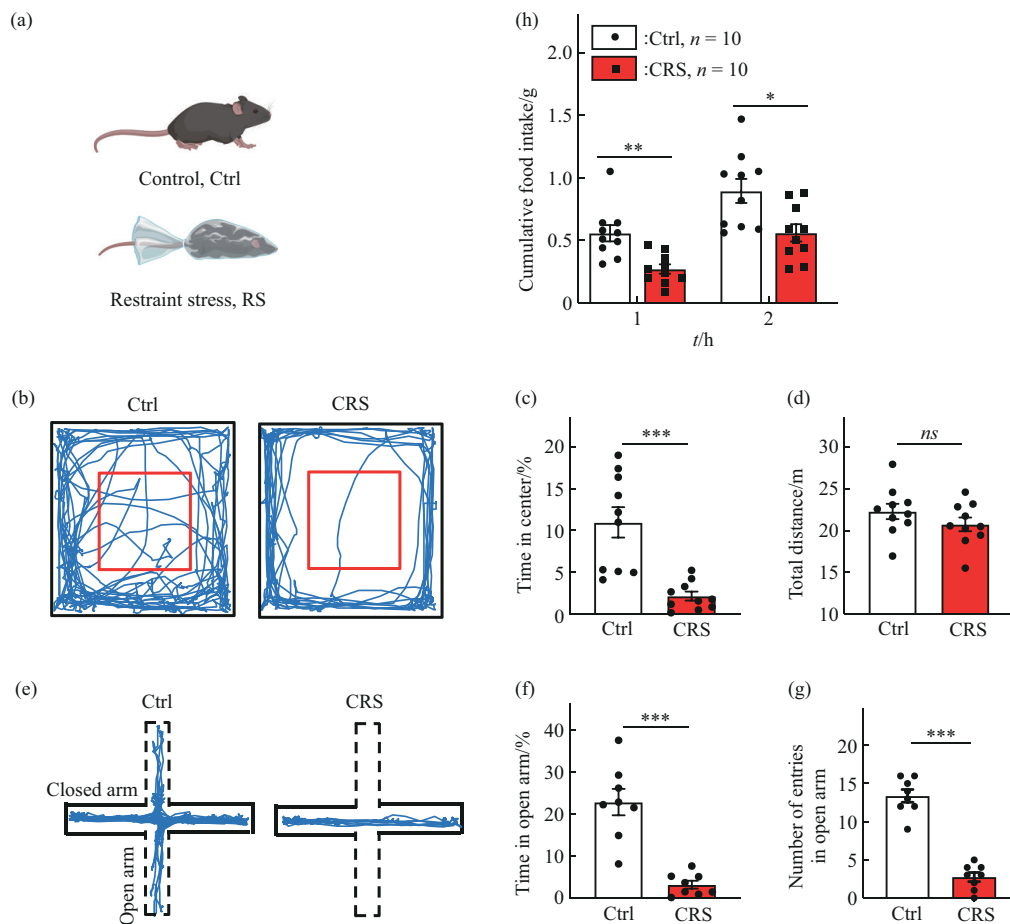


Fig. 1 Chronic restraint stress induced anxiety-like behavior and suppressed food intake

(a) Paradigm of restraint stress model. (b–d) Representative track plot of activity (b), percentage of time in center area (c) and total distance (d) in OFT ($n=10$). (e–g) Representative track plot of activity (e), percentage of time (f) and number of entries (g) in the open arm in EPM ($n=8$). (h) Cumulative food intake in Ctrl and CRS mice after 1- and 2-hour following restraint stress ($n=10$). Student's t test was used. Data represent mean $\pm$ SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, n.s. no significance. OFT: open field test. EPM: elevated plus maze test. CRS: chronic restraint stress.

时表达 tdTomato (红色)。小鼠经过长期束缚压力应激, 最后一次束缚后 2 h 灌注、取脑、切片, 进行 c-Fos 染色 (绿色), 观察长期束缚压力所激活的神经元类型。与对照组小鼠相比, 长期束缚压力的小鼠 PVN 脑区 c-Fos 的表达明显增多 (图 2a), 并且 c-Fos 与 PVN CRH 神经元的共标神经元比例明显增多 ($P<0.001$) (图 2b)。其中, CRS 组约有 $(63.98 \pm 3.08)\%$ 的 CRH 神经元被激活, 而对照组仅有 $(1.69 \pm 0.33)\%$ 的 CRH 神经元被激活。这表明慢性束缚压力可以激活 PVN CRH 神经元。

2.3 直接激活 PVN CRH 神经元产生焦虑样行为

为研究 PVN CRH 神经元是否是焦虑行为产生的必要条件, 利用化学遗传的方法选择性激活 PVN CRH 神经元, 观察其对焦虑行为的影响。如

图 3a, b 所示, 将 AAV-DIO-hM3Dq-mCherry 病毒注射到 CRH-Cre 小鼠的 PVN 脑区。通过腹腔注射 CNO (2 mg/g, i.p.), 特异性的激活 PVN CRH 神经元。与注射生理盐水 (Saline) 组相比, 选择性激活 PVN CRH 神经元, 小鼠在旷场实验中进入中间区域的时间明显减少 ($P<0.05$) (图 3c), 同时, 两组小鼠在旷场的运动总距离没有显著性区别 (图 3d)。与注射生理盐水 (Saline) 组相比, 选择性激活 PVN CRH 神经元, 小鼠在高架十字迷宫实验中进入开臂的时间和次数明显减少 ($P<0.01$) (图 3e, f)。此外, 选择性激活 PVN CRH 神经元使得小鼠的摄食量减少 (图 3g)。这表明 PVN CRH 神经元的激活, 可以诱导小鼠产生焦虑样行为, 并产生摄食减少的现象。

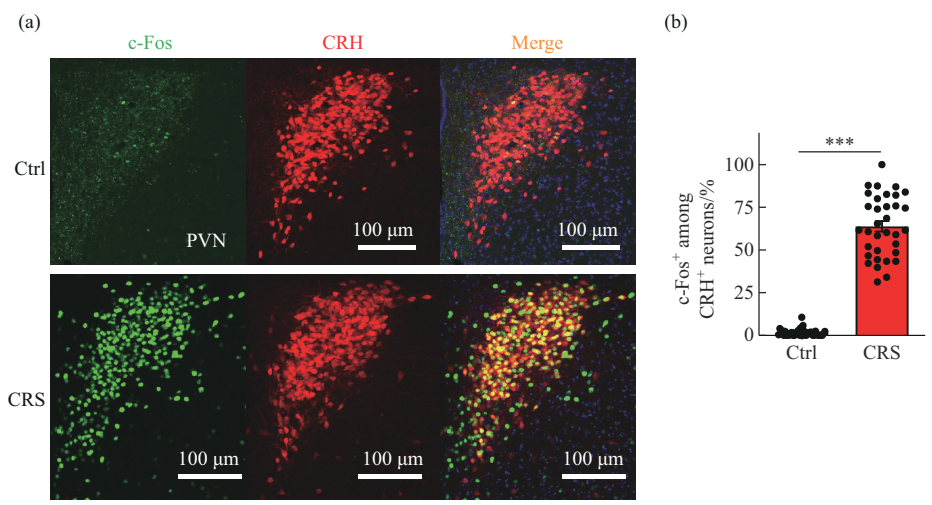


Fig. 2 PVN CRH neurons are activated by chronic restraint stress

(a) Representative immunohistochemical staining of c-Fos expression (green) in PVN CRH neurons (red) in response to restraint stress. (b) Quantification of cell expressing c-Fos in the PVN CRH neurons ($n=40$ sections from 3 mice in Ctrl group and $n=34$ sections from 3 mice in CRS group). Student's t test was used. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $P<0.001$.

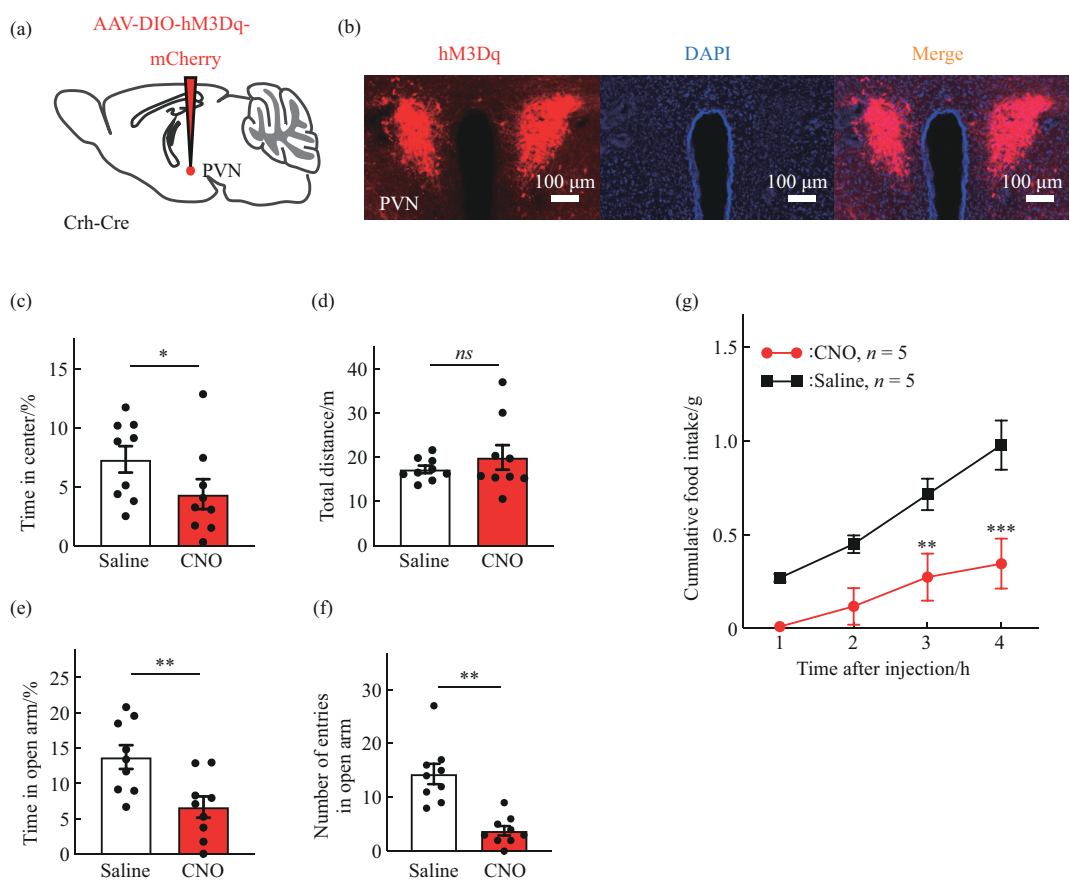


Fig. 3 Activation of PVN CRH neurons triggered anxiety-like behavior

(a, b) Schematic of virus injection (a) and images showing selective expression of hM3Dq (red) in the PVN CRH neurons (b). (c, d) Activation of PVN CRH neurons decreases time spent in center area in OFT ($n=9$) (c), but not affects the total distance (d). (e, f) Activation of PVN CRH neurons decreases time spent in open arm (e) and the number of entries in open arm in EPM (f) ($n=9$ mice). Student's t test was used. (g) Activation of PVN CRH neurons suppresses dark phase food intake ($n=5$). Two-way ANOVA analysis between CNO and saline injections in PVN-CRH-hM3Dq mice was used. Data represent mean $\pm$ SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n.s.$ no significance.

2.4 损毁PVN CRH神经元出现抗焦虑现象

为了观察PVN CRH神经元是否介导束缚压力诱导的焦虑样行为,通过向Crh-Cre小鼠PVN脑区注射AAV-DIO-Caspase3和AAV-DIO-EGFP混合病毒,特异性消融PVN CRH神经元,而对照组小鼠是向Crh-Cre小鼠PVN脑区注射AAV-DIO-EGFP病毒,因此,对照组小鼠PVN CRH神经元显示绿色荧光,而PVN CRH神经元消融后的小鼠PVN脑区不出现绿色荧光(图4a, b)。经过慢性束缚压力后,对PVN CRH神经元凋亡的小鼠行为学进行检测,观察其焦虑样行为,发现在旷场实验中,与对照组小鼠相比,Caspase3组小鼠进入中间区域的时间百分比明显增多($P<0.05$),而两组的总运动距离没有显著性差异(图4c~e)。在高架十字迷宫实验中,Caspase3组小鼠在慢性束缚压力后,仍表现出进入开臂的时间百分比($P<0.01$)和次数($P<0.05$)显著高于对照组小鼠(图4f~h)。这说明慢性束缚压力通过PVN CRH神经元导致小鼠产生焦虑样行为,当PVN CRH神经元消失,相应的焦虑样行为也得到了改善。总的来说,慢性束缚压力诱导焦虑样行为,并且激活PVN CRH神经元,当PVN CRH神经元被损毁,慢性束缚压力应激导致的焦虑样行为得到缓解。

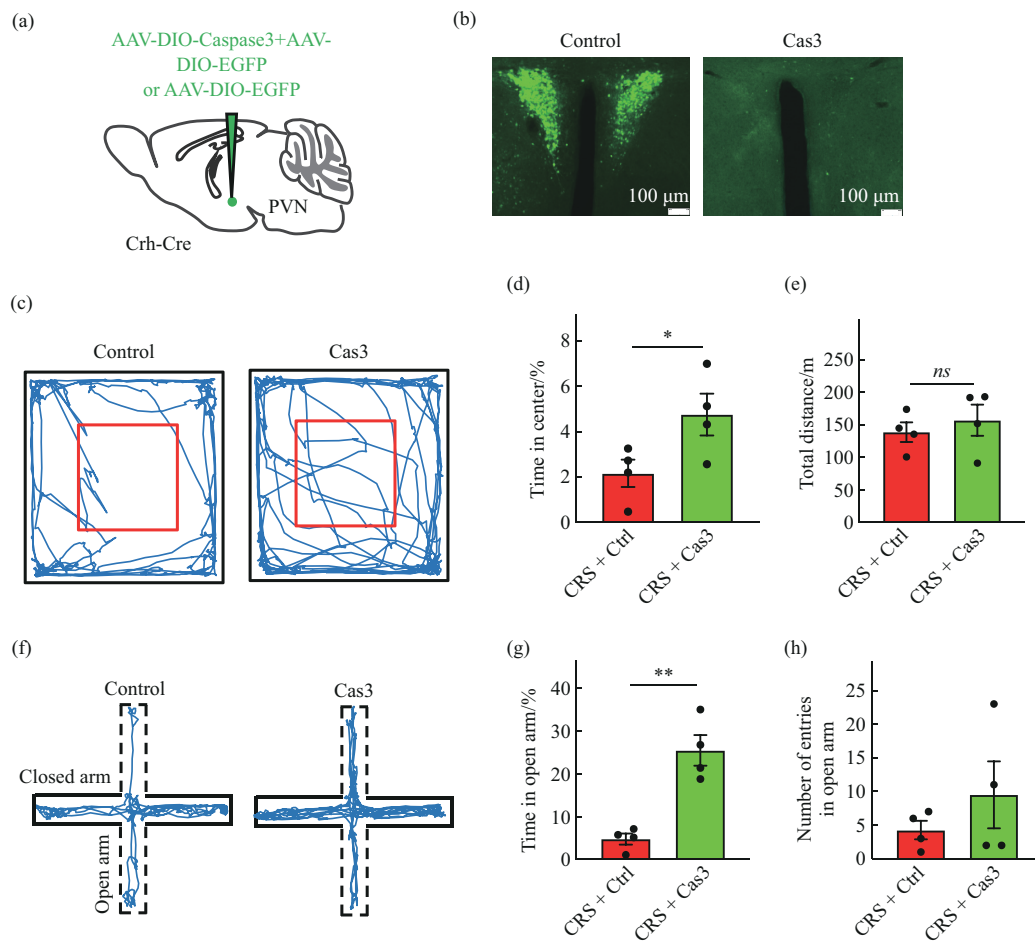


Fig. 4 Ablation of PVN CRH neurons relieves CRS-induced anxiety

(a, b) Schematic of virus injection (a) and images showing selective expression of AAV-DIO-EGFP in Control mice and AAV-DIO-Caspase3+AAV-DIO-EGFP in Caspase3 (Cas3) mice (b). (c-e) Representative track plot activity (c), percentage of time in center area (d) and total distance (e) in OFT in Control and PVN-CRH-Cas3 group after CRS ($n=4$). (f-h) Representative track plot of activity (f), percentage of time in open arm (g) and the number of entries in open arm (h) in Control and Cas3 group after CRS ($n=4$). Student's t test was used. Data represent mean $\pm$ SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, n.s. no significance.

2.5 运动缓解慢性束缚压力造成的焦虑行为

多项研究显示运动能够有效改善压力诱导的焦虑情绪^[1]。为研究运动是否能够缓解14 d连续束缚压力应激造成的焦虑样行为, 对小鼠进行8周的跑台运动, 观察长期有氧运动对压力诱导的焦虑样行为的作用(图5a)。在旷场实验中, 与对照组小鼠相比, 慢性束缚压力应激的小鼠进入中间区域的时间百分比明显减少($P<0.001$), 但运动组的小鼠可以逆转束缚压力应激产生进入中间区域时间百分

比减少的现象($P<0.001$)(图5b, c), 并且3组小鼠在旷场中的总运动距离没有显著性差异(图5d)。同样的, 在高架十字迷宫实验中, 与对照组小鼠相比, 慢性束缚压力应激的小鼠进入开臂的时间百分比($P<0.001$)和次数($P<0.01$)明显减少, 但运动组的小鼠可以逆转束缚压力应激产生进入开臂时间百分比和次数减少的现象($P<0.05$)(图5e~g)。此外, 与CRS组相比, CRS+Ex组小鼠的食物摄入量有所增加($P<0.05$)(图5h)。这说明

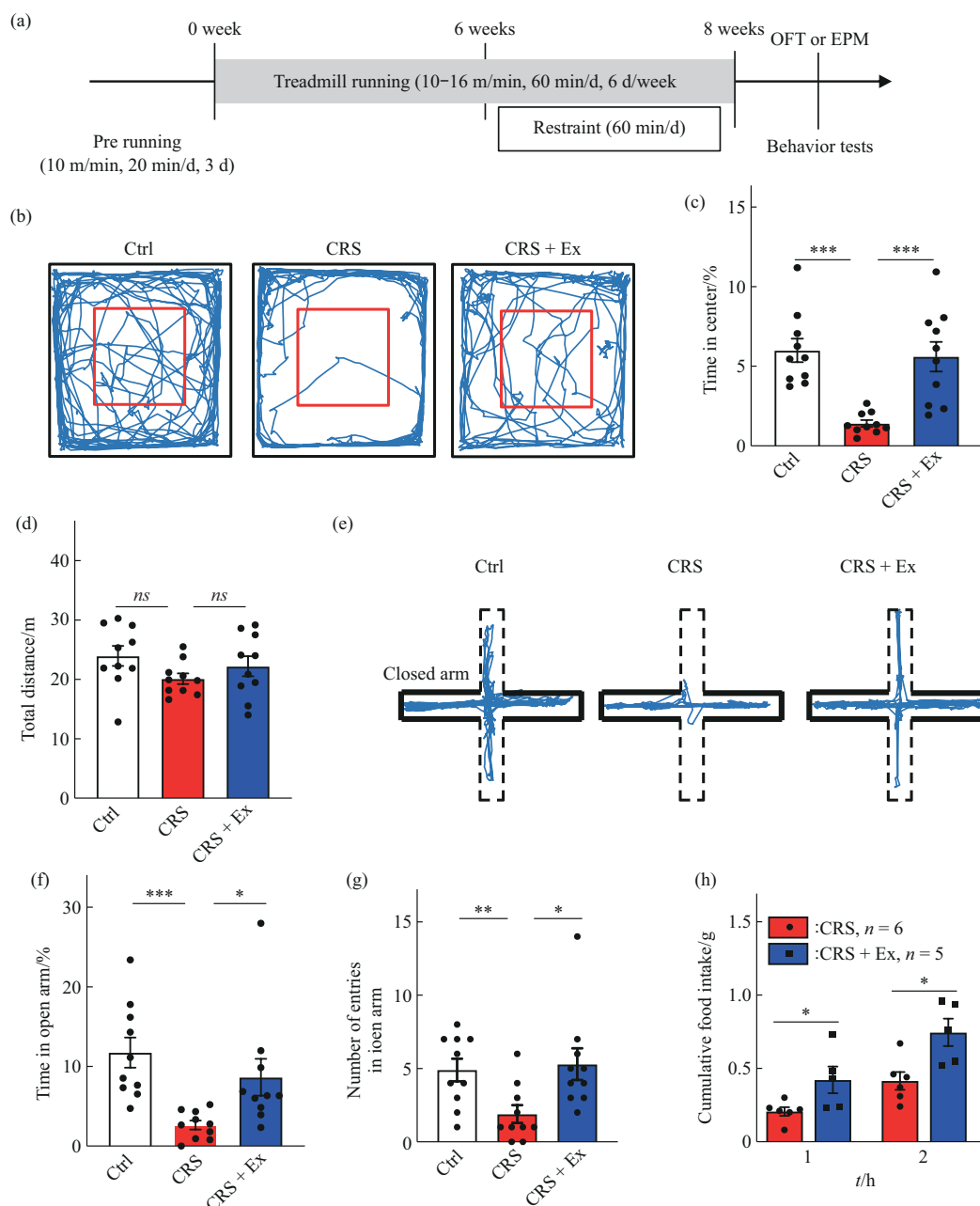


Fig. 5 Exercise relieves chronic restraint stress-induced anxiety like behavior

(a) Experimental scheme. (b-d) Representative track plot of activity (b), percentage of time in center area (c) and total distance (d) in the OFT in Ctrl, CRS and CRS with exercise (CRS+Ex) groups ($n=10$). (e-g) Representative track plot of activity (e), percentage of time in open arm (f) and the number of entries in open arm (g) in EPM in Ctrl, CRS and CRS with exercise (CRS+Ex) groups ($n=10$). (h) Cumulative food intake in CRS ($n=6$) and CRS+Ex ($n=5$). Student's t test was used. Data represent mean $\pm$ SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. n.s. no significance.

运动可以有效地改善慢性束缚压力诱导的焦虑样行为和食欲下降。

2.6 运动通过抑制PVN CRH神经元改善慢性束缚压力诱导的焦虑样行为

为了确定PVN CRH神经元是否参与运动改善压力诱导焦虑的行为,利用CRH: Ai14的小鼠进行图6a所示的造模实验,观察运动对慢性束缚压力产生的影响。在CRS组中,大量c-Fos信号被激活,并且与CRH神经元有大量的共标,而CRS+Ex

组小鼠所激活的c-Fos信号明显减少,与CRH神经元共标的百分比也明显减少($P<0.001$) (图6a, b)。这一结果说明,运动可以抑制由于慢性束缚应激压力导致的PVN CRH的神经元活性增强,而2.4的结果显示, PVN CRH神经元的缺失,改善慢性束缚应激压力所致的小鼠焦虑行为。总的来说, PVN CRH神经元参与运动改善慢性束缚压力诱导的焦虑样行为。

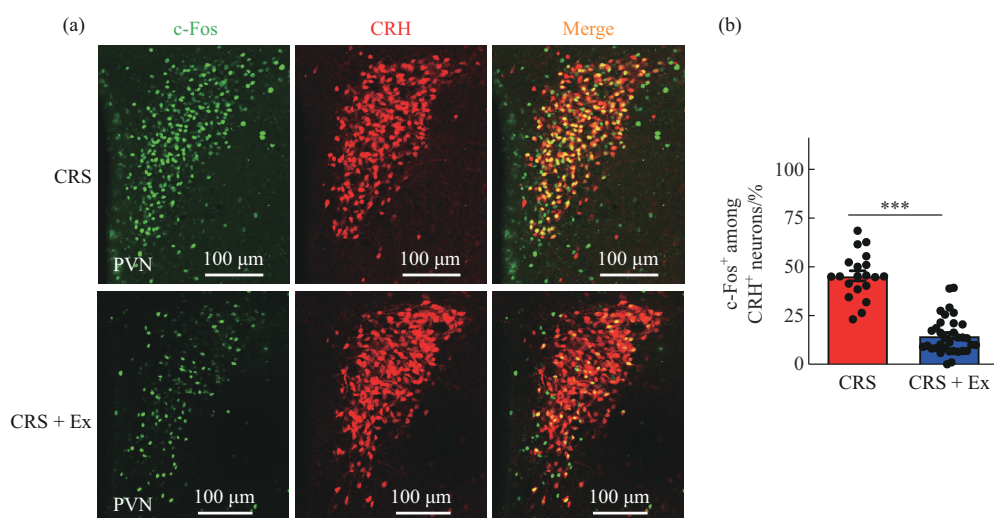


Fig. 6 PVN CRH neurons correlate with exercise-induced stress resilience

(a) Representative immunohistochemical staining of c-Fos expression (green) in PVN CRH neurons (red) in CRS and CRS+Ex group. (b) Quantification of CRS and CRS+Ex group induced c-Fos expression in PVN CRH neurons ($n=36$ sections from 3 mice in CRS group and $n=34$ sections from 3 mice in CRS+Ex group). *** $P<0.001$.

3 讨 论

本研究主要聚焦了两个问题:一是PVN CRH神经元是否参与慢性束缚压力诱导的焦虑样行为,以及其对食欲的影响;二是运动是否通过抑制PVN CRH神经元改善焦虑样行为和食欲下降的现象。结果表明,慢性束缚压力通过激活PVN CRH神经元产生焦虑样行为,并出现摄食抑制的现象。此外,运动通过抑制PVN CRH神经元改善慢性束缚压力导致的焦虑样行为和摄食抑制,提示PVN CRH神经元可能是运动改善压力诱导焦虑情绪和食欲下降的关键靶点。

3.1 PVN CRH神经元是触发慢性束缚压力诱导的焦虑样行为的关键因素

HPA的过度应激是导致精神类疾病发生的病理基础,下丘脑是机体感受机体各种刺激,并做出反

应的起始脑区^[27-28]。有研究显示,下丘脑通过释放CRH激活HPA轴,产生焦虑样行为^[29]。PVN CRH神经元是否直接驱动焦虑样行为,并不清楚。慢性压力被认为是人类和动物产生焦虑样状态的先决条件。本研究证实了PVN CRH神经元参与慢性束缚压力诱导的焦虑样行为。直接激活PVN CRH神经元能够产生焦虑样行为。PVN CRH神经元功能与应激相关的精神类疾病密切相关,因此, PVN CRH神经元是改善焦虑样行为等精神类疾病的关键靶点。

3.2 运动通过PVN CRH神经元减轻慢性束缚压力应激造成的焦虑样行为

运动被认为是缓解精神障碍的有效手段,并且与抗焦虑、抑郁类药物相比,运动几乎没有副作用^[30-31]。因此,研究运动缓解焦虑样情绪的神经机制尤为重要,能够促进临床实践中药物和非药物治

疗的联合治疗。本研究的结果也显示, 运动可以有效缓解束缚压力应激诱导的焦虑样行为, 并且运动可以抑制PVN CRH神经元的活性。PVN CRH神经元是否直接介导运动对压力诱导的焦虑样行为的改善, 还有待进一步研究。

3.3 PVN CRH神经元可能是压力应激和能量平衡调节的交叉点

压力会引起多种适应性生理和行为反应, 使动物能够迅速对威胁情况做出反应。这些反应包括对摄食的影响。为了缓解压力, 机体会选择增加或者减少食物摄入。但是压力是促进还是抑制摄食尚无定论^[32]。本研究发现, 慢性束缚压力应激导致小鼠的摄食量下降, 压力引起的摄食量改变很可能跟PVN CRH神经元的活性有关系, 但是这一改变, 是否与POMC、AgRP、NPY等神经肽相关, 共同调控摄食行为还有待研究。焦虑引起的食欲下降、厌食症等是最近的研究热点^[33]。有氧运动可以改善长期束缚压力应激导致的食欲下降的现象值得关注。本研究认为有氧运动可能通过调节PVN CRH神经元的活性, 影响食欲。但是, 本研究监测时间仅有数小时, 关于有运动对慢性束缚压力应激引起的进食的变化, 还有待进一步研究。对于PVN CRH神经元的研究, 为未来改善精神障碍及代谢状态相关疾病提供了新的思路和角度。

4 结 论

众所周知, 体育运动可以缓解压力导致的精神障碍, 但其潜在的神经机制并不完全清楚。长期以来, PVN CRH神经元被认为与应激反应相关, 并且多项研究显示PVN CRH神经元参与压力和代谢相关过程。本研究发现, 14 d连续束缚压力应激导致小鼠出现焦虑样行为, 并且摄食量减少、食欲下降, 这一行为可以激活PVN CRH神经元。而运动可以逆转束缚压力应激导致的焦虑样行为, 并阻止摄食抑制。但是本研究欠缺关于运动对缓解长期束缚压力导致的食欲恢复的长期影响, 还有待进一步的研究。此外, 我们的研究结果证明了PVN CRH神经元参与运动改善压力诱导的负面影响, 当PVN CRH神经元损毁, 压力所导致的焦虑样行为得到缓解。本文缺少关于参与HPA轴的皮质醇的检测, 以及PVN CRH神经元参与运动改善焦虑样行为的直接证据, 后续还需要深入研究。

总的来说, 体育锻炼是治疗压力相关精神障碍问题的最合理、最佳的治疗策略, PVN CRH神经

元可能是参与运动改善压力诱导焦虑样行为的关键靶点, 充分了解压力应激相关疾病的神经机制对于心理健康的促进至关重要。

参 考 文 献

- [1] Mikkelsen K, Stojanovska L, Polenakovic M, *et al.* Exercise and mental health. *Maturitas*, 2017, **106**: 48-56
- [2] Schneiderman N, Ironson G, Siegel S D. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annu Rev Clin Psychol*, 2005, **1**: 607-628
- [3] Chellappa S L, Aeschbach D. Sleep and anxiety: from mechanisms to interventions. *Sleep Med Rev*, 2022, **61**: 101583
- [4] Huang Y, Wang Y, Wang H, *et al.* Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study. *Lancet Psychiatry*, 2019, **6**(3): 211-224
- [5] Dallman M F, Akana S F, Strack A M, *et al.* Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1018**(1): 141-150
- [6] Tillage R P, Wilson G E, Liles L C, *et al.* Chronic environmental or genetic elevation of galanin in noradrenergic neurons confers stress resilience in mice. *J Neurosci*, 2020, **40**(39): 7464-7474
- [7] McEwen B S, Bowles N P, Gray J D, *et al.* Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci*, 2015, **18**(10): 1353-1363
- [8] Duval E R, Javanbakht A, Liberzon I. Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, **11**: 115-126
- [9] Kim W, Chung C. Brain-wide cellular mapping of acute stress-induced activation in male and female mice. *FASEB J*, 2021, **35**(12): e22041
- [10] Tovote P, Fadok J P, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*, 2015, **16**(6): 317-331
- [11] Kovács K J. CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J Chem Neuroanat*, 2013, **54**: 25-33
- [12] Smith S M, Vale W W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 2006, **8**(4): 383-395
- [13] Deussing J M, Chen A. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. *Physiol Rev*, 2018, **98**(4): 2225-2286
- [14] Jiang Z, Tong Q. Hypothalamic CRH neurons: a crossroad between stress and metabolism. *Curr Opin Endocr Metab Res*, 2022, **26**: 100384
- [15] Anderson E, Shivakumar G. Effects of exercise and physical activity on anxiety. *Front Psychiatry*, 2013, **4**: 27
- [16] Zhang W, Ou H, Zhang B, *et al.* Treadmill exercise relieves chronic restraint stress-induced cognitive impairments in mice *via* activating protein phosphatase 2A. *Neurosci Bull*, 2021, **37**(10): 1487-1492
- [17] Zhou Y S, Meng F C, Cui Y, *et al.* Regular aerobic exercise attenuates pain and anxiety in mice by restoring serotonin-modulated synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex. *Med*

- Sci Sports Exerc, 2022, **54**(4): 566-581
- [18] Ströhle A. Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J Neural Transm (Vienna)*, 2009, **116**(6): 777-784
- [19] Stonerock G L, Hoffman B M, Smith P J, *et al.* Exercise as treatment for anxiety: systematic review and analysis. *Ann Behav Med*, 2015, **49**(4): 542-556
- [20] Yan L, Wei J A, Yang F, *et al.* Physical exercise prevented stress-induced anxiety *via* improving brain RNA methylation. *Adv Sci*, 2022, **9**(24): e2105731
- [21] Leem Y H, Jang J H, Park J S, *et al.* Exercise exerts an anxiolytic effect against repeated restraint stress through 5-HT_{2A}-mediated suppression of the adenosine A_{2A} receptor in the basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, **108**: 182-189
- [22] Athanasiou N, Bogdanis G C, Mastorakos G. Endocrine responses of the stress system to different types of exercise. *Rev Endocr Metab Disord*, 2023, **24**(2): 251-266
- [23] Lark S, Kurtovich R, de Terte I, *et al.* The effect of high-intensity intermittent exercise on chronic stress and potential biomarkers: a pilot study. *J Police Crim Psychol*, 2021, **36**(1): 41-48
- [24] Droste S K, Gesing A, Ulbricht S, *et al.* Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*, 2003, **144**(7): 3012-3023
- [25] Kim K S, Seeley R J, Sandoval D A. Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nat Rev Neurosci*, 2018, **19**(4): 185-196
- [26] Kim M H, Leem Y H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2014, **18**(1): 97-104
- [27] Spencer N J, Hu H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, **17**(6): 338-351
- [28] Yuan Y, Wu W, Chen M, *et al.* Reward inhibits paraventricular CRH neurons to relieve stress. *Curr Biol*, 2019, **29**(7): 1243-1251.e4
- [29] Mitchell C S, Campbell E J, Fisher S D, *et al.* Optogenetic recruitment of hypothalamic corticotrophin-releasing-hormone (CRH) neurons reduces motivational drive. *Transl Psychiatry*, 2024, **14**(1): 8
- [30] Smith P J, Merwin R M. The role of exercise in management of mental health disorders: an integrative review. *Annu Rev Med*, 2021, **72**: 45-62
- [31] Lin X, Zheng J, Zhang Q, *et al.* The effects of mind body exercise on anxiety: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ment Health Phys Act*, 2024, **26**: 100587
- [32] Maniam J, Morris M J. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology*, 2012, **63**(1): 97-110
- [33] Cho D, O'Berry K, Possa-Paranhos I C, *et al.* Paraventricular thalamic *MC3R* circuits link energy homeostasis with anxiety-related behavior. *J Neurosci*, 2023, **43**(36): 6280-6296

Exercise Ameliorates Chronic Restraint Stress-induced Anxiety *via* PVN CRH Neurons*

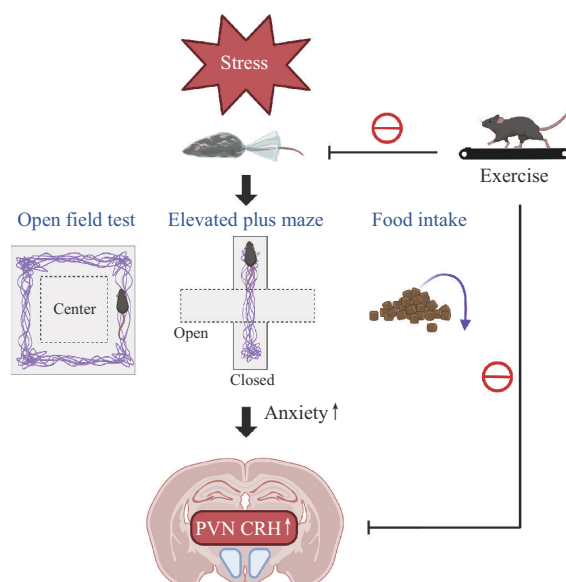
CHEN Jing^{1,2)**,**}, CHEN Cong-Cong^{2)**}, ZHANG Kai-Na²⁾, LAI Yu-Lin³⁾, ZOU Yang²⁾

⁽¹⁾Department of Neurosurgery, Xuanwu Hospital, China International Neuroscience Institute, Capital Medical University, Beijing 100053, China;

²⁾School of Sport Science, Laboratory of Sports Stress and Adaptation of General Administration of Sport, Beijing Sport University, Beijing 100084, China;

³⁾China Volleyball College, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To investigate the role of paraventricular nucleus (PVN) corticotropin releasing hormone (CRH) neurons in chronic restraint stress (CRS)-induced anxiety-like behavior. And whether exercise relieves chronic restraint stress-induced anxiety through PVN CRH neurons. **Methods** Twenty 8-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into control (Ctrl) group and chronic restraint stress (CRS) group. The open field test (OFT) and elevated plus maze (EPM) were used to evaluate anxiety-like behavior of the mice. Food intake was recorded after CRS. Immunofluorescence staining was used to label the expression of c-Fos expression in PVN and calculate the co-expression of c-Fos and CRH neurons. We used chemogenetic activation of PVN CRH neurons to observed the anxiety-like behavior. 8-week treadmill training (10–16 m/min, 60 min/d, 6 d/week) were

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32100821) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2021QN030).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-13241200588, E-mail: zhendehenhaojiya@126.com; chenjing2020@bsu.edu.cn

Received: June 3, 2024 Accepted: September 5, 2024

used to explore the role of exercise in ameliorating CRS-induced anxiety behavior and how PVN CRH neurons involved in it. **Results** Compared with Ctrl group, CRS group exhibited significant anxiety-like behavior. In OFT, the mice in CRS groups spent less time in center area ($P<0.001$). In EPM, the time in open arm in CRS group were significantly decreased ($P<0.001$). Besides, food intake was also suppressed in CRS group compared with Ctrl group ($P<0.05$). Compared with Ctrl group, CRS significantly increase c-Fos expression in PVN and most of CRH neurons co-express c-Fos ($P<0.001$). Chemogenetic activation of PVN CRH neurons induced anxiety-like behavior ($P<0.05$) and inhibited feeding behavior ($P<0.01$). Exercise relieves chronic restraint stress-induced anxiety ($P<0.001$) and relieved the anorexia caused by chronic restraint stress ($P<0.05$). Aerobic exercise inhibited the CRS labeled c-Fos in PVN CRH neurons ($P<0.001$). Furthermore, ablation of PVN CRH neurons attenuated CRS induced anxiety-like behavior. **Conclusion** CRS activated PVN CRH neurons, induced anxiety-like behavior and reduced food intake. 8-week exercise attenuated CRS-induced anxiety-like behavior through inhibiting PVN CRH neuron. Ablation of CRH PVN neurons ameliorated CRS-induced anxiety-like behavior. These finding reveals a potential neural mechanism of exercise-relieving CRS-induced anxiety-like behavior. This provides a new idea and theoretical basis for the treatment of anxiety and related mental disorders.

Key words chronic restraint stress (CRS), anxiety-like behavior, PVN CRH neuron, exercise

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0241

CSTR: 32369.14.pibb.20240241