

慢性应激对大鼠海马锥体细胞形态结构的效应

张艳美* 杨 权 许崇涛 李康生 李伟秋

(汕头大学医学院中心实验室, 汕头 515031)

摘要 为研究慢性应激相关精神障碍的发病机制, 采用尼氏 (Nissl) 染色法、高尔基 (Golgi) 镀染法和透射电镜技术, 探讨慢性应激对大鼠海马 CA1、CA3 区锥体细胞形态结构的效应。结果显示应激组大鼠海马 CA1 区锥体细胞形态结构较对照组无明显变化。应激组海马 CA3 区锥体细胞数 (35.14 ± 3.85) 较对照组 (38.74 ± 3.54) 显著减少 ($P < 0.05$); 顶树突的总长度 ($155.67 \mu\text{m} \pm 33.32 \mu\text{m}$) 较对照组 ($195.63 \mu\text{m} \pm 34.61 \mu\text{m}$) 显著缩短 ($P < 0.05$); 应激组大鼠海马 CA3 区锥体细胞出现超微结构的改变, 包括细胞固缩、体积缩小、核膜皱缩、线粒体变性和粗面内质网模糊不清。这提示海马 CA3 区锥体细胞形态结构的改变, 可能是慢性应激相关精神障碍的病理生理基础。

关键词 应激, 海马, 锥体细胞

学科分类号 Q954.67

应激是指导致机体产生紧张反应的刺激。生物在生存过程中会面临各种各样的刺激, 并作出反应, 适度的应激可以促进机体的适应能力, 严重以及慢性应激则损害机体, 导致疾病。流行病学资料显示: 慢性应激与很多精神障碍如复发性抑郁症和创伤后应激障碍 (posttraumatic stress disorder, PTSD) 的发病密切相关^[1,2]。海马既介导了应激的神经内分泌反应, 又参与了学习记忆及情绪反应等精神活动, 故它是探讨应激与精神疾病之间相互关系的众多研究中的一个焦点^[3,4]。国外有资料表明, 慢性应激可以导致动物海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞形态结构受损, 并认为这可能与随后发生的精神障碍有关, 但国内这方面的研究尚少见^[5,6]。有鉴于此, 我们拟采用神经元的特殊染色技术和电子显微镜技术, 探讨慢性应激时海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞形态结构的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

甲苯胺蓝 (Toluidine Blue O): AMRESCO 产品; 重铬酸钾: 国产分析纯; 硝酸银: 国产分析纯; 钼酸: 国产分析纯; 醋酸双氧铀: 国产分析纯; 雄性 SD 大鼠 26 只, 体重 180 g~240 g, 由中山医科大学实验动物中心购买, 随机分对照组和应激组, 每组 13 只。实验前在安静的环境下适应性饲养 1 周, 自由获得食物和饮水, 自然昼夜节律光照。

1.2 方法

1.2.1 慢性应激模型的建立: 应激源为强迫游泳。

每天上午 10:00 将大鼠置于长宽为 80 cm × 40 cm、水深 20 cm、水温恒定 25℃ 的玻璃缸中强迫游泳 15 min, 共 4 周。

1.2.2 海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞计数: 应激组完成 4 周强迫游泳而对照组则在笼中饲养 4 周后杀死大鼠, 取出大脑。将大鼠左侧脑组织置于 10% 的福尔马林溶液中固定 24 h 后, 常规石蜡包埋。每只动物在矢状缝旁 1~4 mm 范围内, 等间隔取 4 张矢状面切片, 片厚 6 μm 。切片采用尼氏 (Nissl) 染色, 具体方法为: 切片脱腊至水, 蒸馏水洗; 加 1% Toulidine Blue O 水溶液后置于 54℃ 温箱内浸染 25 min; 蒸馏水稍洗, 95% 乙醇分化 30 s; 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。光镜下 ($\times 400$) 对海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞进行双盲法计数 (CA1 区选取细胞数较为恒定的中段)。计数方法如下: 每张切片取连续的两个视野, 并保证锥体细胞层的弧度弦置于目镜的直径上, 取两视野的平均值为该切片锥体细胞数, 4 张切片的平均值为该样本的锥体细胞数。

1.2.3 海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞顶树突总长度和一级树突直径测定: 实验方法和动物处理同上。将右侧脑组织置于 10% 的福尔马林溶液中固定 48 h 后, 以矢状缝为界, 旁开 1 mm 为基面, 修成 5 mm 厚的组织块。采用 Golgi 染色法, 具体

* 通讯联系人。

Tel: 0754-8900397, E-mail: yanmei_zh@yahoo.com

收稿日期: 2002-02-04, 接受日期: 2002-03-29

步骤为: 自来水冲洗 20 min 后置于 37℃ 温箱内用 3% 重铬酸钾溶液媒染 3 天, 每天换液一次; 取出后用蒸馏水洗 1 min, 置于 37℃ 温箱内用 1.5% 的硝酸银溶液浸染 3 天, 每天换液一次; 取出后蒸馏水洗 7 min, 制作矢状面的石蜡切片, 片厚 25 μm ; 经二甲苯脱蜡后, 直接封片观察. 每一样本选取 6 张切片, 锥体细胞顶树突总长度和一级树突直径测定方法参照 Magarinos 等^[7] 方法, 随机分别选取符合条件的 8 个浸染的 CA1 或 CA3 区锥体细胞, 利用图像分析系统、Jandel SigmaScan Pro 软件, 对锥体细胞的顶树突总长度及一级树突直径进行测量, 取其均值作为该样本顶树突总长度和一级树突直径. 顶树突总长度是指树突的起始部至其最高分支末端之间的最长距离. 一级树突直径是指其分支点与胞体间中部之直径.

1.2.4 海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞超微结构的观察: 每组大鼠各两只, 应激组完成 4 周强迫游泳而对照组则在笼中饲养 4 周后将大鼠用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔麻醉后剪开头皮, 暴露颅骨, 由枕骨大孔处迅速剪开颅骨, 剥离脑组织, 在游离海马前不切断血供. 游离海马, 在含 2% 预冷的戊二醛溶液中, 将海马切成 1 mm 厚左右的横断薄片, 30 min 后, 再次在固定液中切取 < 1 mm³ 的海马 CA1 区和 CA3 区小组织块, 继续固定 2 h; 磷酸缓冲液冲洗后 2% 锇酸后固定 1 h; 梯度乙醇脱水, 并同时用溶于 70% 乙醇中醋酸铀进行块染; 置于苯二甲酸二丙酯 (diallyl phthalate, PDAP) 渗透 24 h; 以 PDAP 包埋后, 63℃ 聚合 72 h; 半薄切片定位海马锥体细胞层后进行修块, 超薄切片; 枸橼酸铅染色后上镜观察并照相.

1.3 统计学检验

实验结果用 SPSS 10.0 统计软件分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 t 检验对两组之间的均数进行比较.

2 结 果

2.1 海马锥体细胞计数

光镜下可见两组大鼠海马 CA1 区的锥体细胞排列均整齐、密集, 每个高倍视野下 ($\times 400$) 的锥体细胞数比较, 差异无显著性. 对照组大鼠海马 CA3 区锥体细胞排列较整齐、密集, 胞浆中尼氏质清晰可见 (图 1a). 应激组大鼠海马 CA3 区锥体细胞排列稀疏, 细胞间隙增大, 许多细胞胞浆中尼氏质减少或消失 (图 1b). 经计数发现, 应激组海

马 CA3 区锥体细胞数显著少于对照组, $P < 0.05$ (表 1).

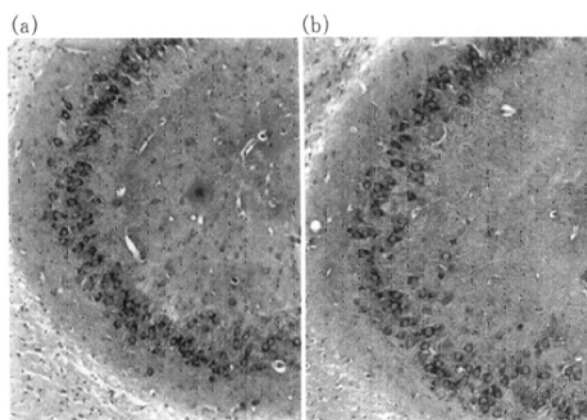


Fig. 1 The arrangement of hippocampal CA3 pyramidal neurons ($\times 100$)

(a) control group; (b) stress group.

Table 1 The comparisons of number of hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons between two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	CA1	CA3
Stress	11	82.71 $\pm$ 14.54	35.14 $\pm$ 3.85*
Control	11	84.35 $\pm$ 7.75	38.74 $\pm$ 3.54
<i>t</i>		0.329	2.283
<i>P</i>		0.745	0.034

* $P < 0.05$, significantly different from control group.

2.2 海马锥体细胞顶树突总长度和一级树突直径

表 2 为两组大鼠海马 CA1 和 CA3 区锥体细胞顶树突总长度和一级树突直径测量的结果, 可见两组大鼠海马 CA1 区锥体细胞顶树突总长度和一级树突直径差异无显著性, $P > 0.05$; 应激组大鼠海

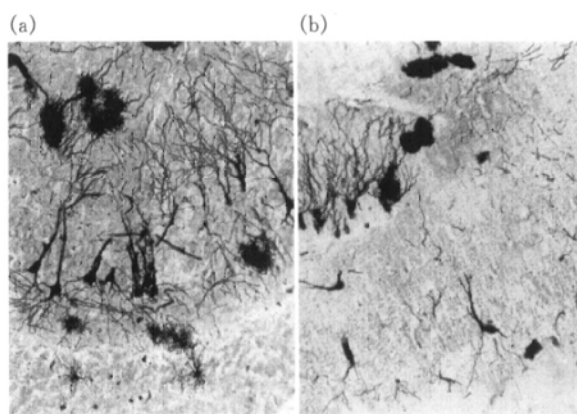


Fig. 2 The whole profile of hippocampal CA3 pyramidal neurons ($\times 100$)

(a) control group; (b) stress group.

马 CA3 区锥体细胞顶树突总长度较对照组缩短, 级树突的直径差异无显著性 $P > 0.05$. $P < 0.05$ (图 2). 两组间海马 CA3 区锥体细胞一

Table 2 The comparisons of total length of apical dendrite and diameter of primary dendrite of hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons between two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CA1		CA3	
		Total length of apical dendrite	Diameter of primary dendrite	Total length of apical dendrite	Diameter of primary dendrite
		/ μm	/ μm	/ μm	/ μm
Stress	11	209.09 $\pm$ 39.27	4.37 $\pm$ 0.25	155.67 $\pm$ 33.32*	6.18 $\pm$ 0.95
Control	11	203.66 $\pm$ 41.43	4.49 $\pm$ 0.06	195.63 $\pm$ 34.61	5.38 $\pm$ 1.00
<i>t</i>		0.315	0.622	2.758	1.922
<i>P</i>		0.756	0.544	0.012	0.069

* $P < 0.05$, significantly different from control group.

2.3 海马锥体细胞超微结构的变化

电镜下, 两组大鼠海马 CA1 区、对照组大鼠海马 CA3 区锥体细胞超微结构均正常 (图 3a). 慢性应激组大鼠海马 CA3 区锥体细胞可见以下超微

结构的改变: 细胞固缩、体积缩小, 细胞膜及内质网膜溶解, 胞浆凝固、密度增高, 粗面内质网模糊不清, 线粒体嵴减少、模糊并可见空泡样变性, 核膜呈波浪状皱缩 (图 3b 和图 3c).

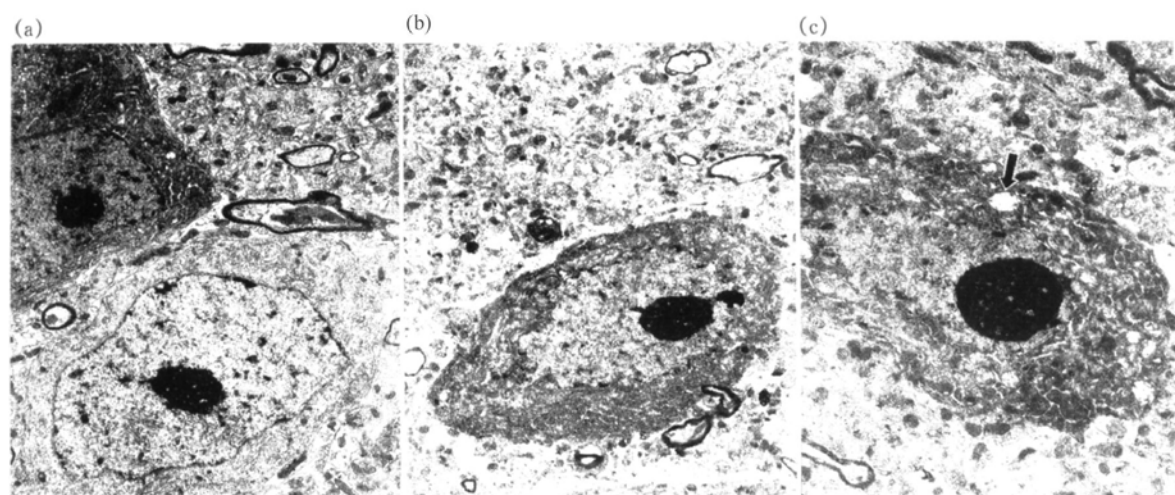


Fig. 3 The ultrastructure of hippocampal CA3 pyramidal neurons

(a) control group; (b) and (c) stress group. Arrow showed vacuolar mitochondrion ($\times 5\,000$ for a and b, $\times 7\,000$ for c).

3 讨 论

海马是大脑的一个重要结构, 它在学习和记忆功能以及调节神经内分泌和自主神经活动中起着重要作用. 海马也是介导应激反应的重要脑区, 对认知性应激反应尤为重要; 同时, 海马富含各种信使受体, 是应激激素作用的一个靶区, 也是大脑具有可塑性和极易受损的一个脑区. 许多损伤因素如休克、缺氧、头部创伤和癫痫发作均可引起海马的损害^[8,9].

1934 年, Lorente de No 根据海马细胞构筑及纤维联系不同, 将海马本体分为 CA1~CA4 四个亚区, 其中 CA2 小而不易辨认, CA4 有时指齿状回的多形层, 有时指伸入齿状回的锥体细胞区, 为避免混淆, 已基本不用. 因此, 海马通常由 CA1 和 CA3 两个亚区组成. 本研究结果清楚地显示, 慢性应激组大鼠海马 CA3 区锥体细胞排列稀疏, 尼氏物质 (即电镜下聚集在一起的粗面内质网) 减少或消失. 尼氏物质是细胞合成蛋白质的场所, 它的结构正常与否反映细胞的功能状态, 本实验结果

正反映了应激组的海马 CA3 区锥体细胞功能降低。另外, 实验结果显示 4 周应激后, 海马 CA3 区锥体细胞数明显减少和顶树突总长度明显缩短; 在电镜下还可见从细胞膜、重要细胞器到核膜等一系列超微结构的损害。但在本研究中却并未观察到应激组大鼠海马 CA1 区锥体细胞发生上述变化。有关应激和海马的研究中, 多数资料显示慢性应激可以损伤动物海马 CA3 区的锥体细胞^[6, 7, 10]。如胡旺平等^[11]报道慢性应激可造成海马 CA3 区神经元丢失; Magarinos 等^[7, 10]报道慢性应激致大鼠及树鼯海马 CA3 区锥体细胞顶树突长度缩短。也就是说多数学者赞同海马 CA3 区是一个对应激极度敏感的亚区。但也有学者报道, 慢性应激可导致海马 CA1 区锥体细胞受损。如 Sousa 等^[5] (2000 年) 发现不可预测的慢性应激既使大鼠海马 CA3 区锥体细胞的树突总长度减少 28%, 也使 CA1 区锥体细胞树突总长度减少 13%。研究结果的差异是否为刺激的强度不同所致有待于进一步研究。

慢性应激致海马损伤的机制尚不十分清楚。目前认为高糖皮质激素血症可能是其中的主要原因^[8, 9, 12, 13]。O'Brien^[14]把高糖皮质激素血症和海马受损之间互为促进的关系描述为糖皮质激素级联假说, 并认为这一毒性级联反应可能是应激相关疾病如复发性抑郁症、PTSD 的发病机制之一。另外, Magarinos^[13]和 Weiland^[15]等认为兴奋性氨基酸, 尤其是谷氨酸 (glutamate, Glu) 及其受体异常分泌也可能介导了慢性应激引起的海马损害。海马内绝大多数神经元属于 Glu 能神经元, 而 CA3 区的神经元全部为 Glu 能神经元^[16]。因此, 慢性应激时高浓度 Glu 的毒性能合理解释海马 CA3 区神经元较 CA1 区神经元更易受损。

总之, 我们的实验显示了慢性应激可以导致海马 CA3 区锥体细胞丢失、顶树突总长度缩短和超微结构改变但对 CA1 区锥体细胞形态结构无明显影响。针对慢性应激导致海马 CA3 区锥体细胞受损机制的研究不但有助于了解海马 CA1 区和 CA3 区除细胞构筑不同之外的神经生化差异, 更有助于阐明应激相关精神障碍如复发性抑郁症和 PTSD 的发病机制, 从而有效地预防和治疗这类疾病。

参 考 文 献

- 1 Checky S. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Biol Psychiatry*, 1996, **52** (3): 597~ 617
- 2 Bremner J D. Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry*, 1999, **45** (7): 797~ 805
- 3 杨 权. 下丘脑-垂体-肾上腺轴应激反应的中枢控制. *生理科学进展*, 2000, **31** (3): 222~ 226
Yang Q. Prog Physiol Sci, 2000, **31** (3): 222~ 226
- 4 Herman J P, Cullinan W E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 1997, **20** (2): 78~ 84
- 5 Sousa N, Lukyanov N V, Madeira M D, *et al.* Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 2000, **97** (2): 253~ 266
- 6 Watanabe Y, Gould E, McEwen B S, *et al.* Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 1992, **588** (2): 341~ 345
- 7 Magarinos A M, McEwen B S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, 1995, **69** (1): 83~ 88
- 8 McEwen B S. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 1999, **22**: 105~ 122
- 9 Duman R S, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, 1999, **46** (9): 1181~ 1191
- 10 Magarinos A M, McEwen B S, Flugge G, *et al.* Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*, 1996, **16** (10): 3534~ 3540
- 11 胡旺平, 严 进, 路长林, 等. 睫状神经营养因子对应激大鼠行为和海马神经元的影响. *中国行为医学科学*, 1998, **7** (3): 174~ 175
Hu W P, Yan J, Lu C L, *et al.* *Chin J Behav Med Sci*, 1998, **7** (3): 174~ 175
- 12 Sapolsky R, Uno H, Robert C, *et al.* Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 1990, **10** (9): 2897~ 2904
- 13 Magarinos A M, McEwen B S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 1995, **69** (1): 89~ 98
- 14 O'Brien J T. The 'glucocorticoid cascade' hypothesis in man: prolonged stress may cause permanent brain damage. *British Journal of Psychiatry*, 1997, **170**: 199~ 201
- 15 Weiland N G, Orchinik M, Tanapat P. Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus. *Neuroscience*, 1997, **78** (3): 653~ 662
- 16 严 进, 汤淑萍, 路长林, 等. 睫状神经营养因子对应激引起大鼠海马 CA3 神经元的损害作用. *解剖学报*, 1999, **22** (3): 99~ 103
Yan J, Tang S P, Lu C L, *et al.* *Chinese Journal of Anatomy*, **22** (2): 99~ 103

Effects of Chronic Stress on Morphology and Structure of Hippocampal Pyramidal Neurons in Rats

ZHANG Yan-Mei*, YANG Quan, XU Chong-Tao, LI Kang-Sheng, LI Wei-Qiu

(Central Laboratory, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract In order to study the pathogenesis of stress-related mental disorders, Nissl staining, Golgi staining and electron-microscope were used to explore the effects of chronic stress on morphology and structure of hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons in rats. The results showed that no changes of morphology and structure were observed in hippocampal CA1 pyramidal neurons in stress group. The number of hippocampal CA3 pyramidal neuron of stress group (35.14 ± 3.85) was significantly less than that of control group (38.74 ± 3.54), $P < 0.05$. The total length of apical dendrite of stress group ($155.67 \mu\text{m} \pm 33.32 \mu\text{m}$) was significantly shorter than that of control group ($195.63 \mu\text{m} \pm 34.61 \mu\text{m}$), $P < 0.05$. In addition, the ultrastructural changes, including the condensation of the cytoplasm, the reduction of the cell volume, the shrinkage of the nucleus membrane, the degeneration of the mitochondria, and the illegibility of the rough endoplasmic reticulum, were observed in hippocampal CA3 pyramidal neurons in chronic stress rats. It is suggested that the changes of morphology and ultra structure of pyramidal neurons in hippocampal CA3, not in CA1, would underlie the pathophysiology of the stress-related mental disorders.

Key words stress, hippocampus, pyramidal neuron

* Corresponding author. Tel: 86-754-8900397, E-mail: yanmei_zh@yahoo.com

Received: February 4, 2002 Accepted: March 29, 2002

欢迎订阅 2003 年《微生物学杂志》

《微生物学杂志》是包括工业微生物学、农业微生物学、医学医药微生物学、食用菌及生物工程学在内的综合性学术刊物,为我国生物学核心期刊。1987年开始被美国《化学文摘》、《中国生物学文摘》等国内外重要检索刊物摘引和收录。主要任务有开展学术交流,反映国内外微生物领域的进展与方向,提高广大微生物学工作者的业务水平,为科研工作的正确开展,为生产建设的顺利进行,为加速科研成果诞生和立项论证发挥预见性和导向性,同时为加速科研成果的转化,指导生产,促进科技致富作出了积极贡献。

本刊为微机排版、胶版印刷,主要栏目有“研究报告”、“研究简报”、“实验与技术”、“进展与评述”、“开发与应用”、“专题议述”、“论文摘要”、“技术讲座”、“科技信息与服务”及“会议简讯”等。读者对象为本学科的科技工作者、大中专院校师生、企业、厂家及微生物学爱好者。

本刊创办于1978年,国内外公开发行,双月刊,大16开本,64页,每期6.50元,全年订费39.00元,各地邮局均可订阅,邮发代号:8-142,若错过邮局订阅,请直接与编辑部联系。

编辑部地址:辽宁省朝阳市文化路二段22号《微生物学杂志》编辑部

帐户:0713020309249016509,务必注明联系人姓名。

邮编:122000

编辑部办理缺刊补订和零售服务,欢迎订阅。

订购电话:0421-2914613

E-mail: lnwsuxh@mail.cypptt.ln.cn