

• 综述 •

拘束应激动物模型的研究现状与应用

何蓉蓉^{1,2}, 姚新生^{1,2}, 栗原博^{2*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 100016; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 拘束负荷动物表现出的应激反应可以部分描述心理应激状态,可以在多靶点整体动物水平上进行观察,在药理学、生理学及病理学等多种研究领域被国内外广泛应用。本文介绍了拘束应激模型的发展历史,概述了国内外有关模型的制作及模型影响因素,综述拘束应激对机体的影响及作用机制,同时结合我们的实际经验提出该模型存在的问题,并对其研究应用前景进行展望。

[关键词] 拘束应激; 心理应激; 内环境稳定

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2008)08-0080-04

The Review on Animal Model of Restraint Stress

HE Rong-rong^{1,2}, YAO Xin-sheng^{1,2}, KURIHARA Hiroshi^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] Animal model of restraint stress shows some of the mental stress responses, and could be observed on entire animal level for multi-target studies. The model is widely applied in pharmacology, physiology and pathology. We introduce the history of restraint stress model, summarize the preparation and influential factors of modeling, and review the impacts induced by stress on the body as well as its mechanism. In addition, we also discuss the problems and prospect based on our experiments.

[Key words] restraint stress; mental stress; homeostasis

随着生活方式的改变,现代人更多是在面对环境变化、生活习惯改变及物理化学等各种应激原所带给人们的身心疲劳。为缓解应激原的压力,需要通过神经、内分泌及免疫系统来调整机体的内环境稳定。研究应激反应机制、寻找预防、缓解及消除应激性疾病的有效途径是目前急待解决的社会问题,电刺激、热刺激、冷刺激、夹尾、强迫运动及拘束等各种应激动物模型广泛用于应激反应机制及应激性疾病的研究中。其中,以剥夺身体自由活动、拘束制动刺激为应激原的拘束应激(restraint stress),动物模型,因其可以部分描述心理应激状态,利于动物整体评价,可重复性好,在药理学、生理学及病理学等方面的研究中被广泛应用。此外,至今为止

的研究证明拘束应激负荷动物模型也可以部分模拟中医情志致病过程,可能在探讨中药作用机制上具有一定的价值。

1 应激及拘束应激模型的由来

应激反应是机体对应激原负荷产生的在心理和生理过程的不协调症状。是来自各种外界刺激因素(stressor)作用时所引起的一种临床症候群。上个世纪六十年代初, Bonfils 等在研究中确认并制备了拘束应激负荷可以显著引起胃溃疡发生的动物模型,为此,拘束负荷动物实验得以广泛应用^[1]。1971年, Brodie 等对拘束应激负荷如何诱发病理学改变进行大量研究的基础上,发表了相关综述^[2],而后关于拘束应激方法和其对生理机能、病理过程的影响及药物干预作用等方面的研究有了很大的进展。

2 拘束应激反应的影响因素

动物种系会影响拘束应激反应,例如情绪易激动或野生的实验动物要比性格温顺或驯养的实验动物对拘束负荷的

[收稿日期] 2008-03-31

[基金项目] 广州市中药现代化研究重大科技专项(2004ZF-E5011)

[通讯作者] * 栗原博, Tel: (020) 85221352; E-mail: hiroshi.kurihara@163.com

应激反应程度会更强一些。Violenko 等研究发现拘束负荷能使攻击性强的 C57BL 小鼠脑内单胺氧化酶表达明显减少,但对攻击性较弱的 CBA 小鼠影响并不明显^[3]。因此实验前需慎重考虑对实验动物种类、品系的选择。以保证实验结果的可重复性。

动物年龄也会影响拘束应激反应的结果。Shvets 等发现拘束应激对不同周龄的 Wistar 大鼠体内的抗氧化酶的活性影响不同^[4]。Ida 等发现老化大鼠拘束应激后血浆肾上腺酮含量会在长时间内保持较高水平,而且大脑中的去甲肾上腺素能神经功能也显示难以恢复的状态^[5]。

尽管至今为止在探讨实验动物性别对拘束应激效果影响的研究结论并不完全一致,但动物对应激的反应无疑会受到性周期的影响,因此,实验大多采用雄性动物。但 Kuyhara 等在研究拘束应激对机体代谢水平的影响时发现,雌性小鼠与雄性小鼠相比实验结果却相对稳定^[6]。

时辰和季节也会影响动物的拘束应激反应。由于大部分拘束应激研究是采用夜行性啮齿动物,Sage 等的研究证实对这些动物在深夜进行拘束应激比其他时段所导致的应激损伤程度更明显。这种昼夜节律对拘束应激的影响在促肾上腺皮质激素及血浆肾上腺酮等指标更为显著。Stackpole 等人也认为拘束应激对促黄体生成激素的影响存在一定的季节性^[7]。

拘束负荷时间及观察时间也会直接影响实验结果。由于拘束应激反应主要影响机体内富有反馈调节、且具有很强自稳功能的免疫、神经及内分泌系统,因此当应激原撤除后这种反馈调节系统的生理活性常出现一时性代偿性增高,模型回复一段时间后这种代偿机制慢慢消失。人们根据这种生理特性常用于观察药物对拘束应激后不同时段的影响。我们在拘束负荷小鼠的免疫损伤模型研究运用过程中发现小鼠拘束 12 h 后的第 3 天,脾脏淋巴细胞数和 NK 细胞活性下降到最低值^[18]。

饮食也会影响到拘束应激效果。Nakamura 等的研究发现食物剥夺本身也是一种应激原,会引起机体免疫等生理功能的改变,因此在实验过程中对照组动物也应该禁水禁食^[9]。此外,灯光、噪音及室温等环境条件和拘束次数等一些其他因素,也对该模型的研究和利用产生一定的影响。

因此,拘束应激模型使用前应注意选择动物品系、周龄、性别、方法、持续时间、时辰、季节及饮食的影响,以达到重复可行的应激反应结果。

3 拘束应激对机体生理机能的影响

至今为止,已有很多研究证明拘束负荷应激涉及到中枢皮层及边缘系统和下丘脑-垂体-肾上腺轴的神经递质、神经肽、激素、基因表达等多层次及多方面,显著影响神经-内分泌系统的生理机能,可以部分反应心理应激状态。Zhang 等发现,拘束应激后脑区去甲肾上腺素、多巴胺、3,4-二羟苯乙酰乙酸水平明显增加^[10]。Henrik 等证实拘束应激能增加脑内 5-羟色胺(5-HT)及其代谢物 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)水平,并

发现 5-HT 对应激引发的 ACTH 释放有调节作用^[11]。Bonnin 等的实验结果提示脑内存在一种 5-HT 调节肽,对 5-HT_{1B} 受体有变构调节作用,急性拘束应激可以增加该物质在皮质、海马及下丘脑内的含量,抑制 5-HT 与 5-HT_{1B} 受体结合的负反馈效应,促进 5-HT 释放^[12]。此外,人们也注意到急性拘束应激可使大鼠脑部及丘脑-垂体-肾上腺轴各组成部分的肾上腺髓质激素明显增加^[13],而急性和慢性拘束都能导致脑内组胺增加从而引起应激性焦虑或抑郁^[14]。对孕鼠的拘束应激能导致后代学习记忆功能的衰退,海马 PKC β 1 的表达受损^[15]。急性拘束应激 3 h 后,大鼠和小鼠室旁核的 α -fos 和 CRF mRNA (促肾上腺皮质激素释放因子 mRNA) 的表达增高,而 CRFR-1 mRNA 的表达只有在大鼠室旁核的表达有提高,在小鼠中并没有检测到相同的结果,提示拘束应激对大鼠和小鼠的 CRF and CRFR-1 基因的表达的影响存在差异^[16]。拘束应激可在一定程度上引起脑组织的缺血状态和诱发活性氧产生,过氧化脂质在大脑皮质的蓄积可以引起脑抗氧化系统损伤^[17]。Ghizoni 等研究发现,拘束负荷 2~4 h 提高了小鼠谷胱苷肽水平,而对大鼠皮质纹状体和海马中谷胱苷肽的水平没有显著影响。当他们使用 NOS 抑制剂时注意到小鼠脑组织不同部位的谷胱苷肽水平都显示升高,表明急性拘束应激选择性影响脑组织内的谷胱苷肽水平^[18]。

拘束应激也能明显影响机体的免疫功能。很多研究证明应激会导致免疫机能低下。拘束应激能显著降低脾脏重量,造成胸腺萎缩,这可能来自内源性糖皮质激素增多,直接影响及作用免疫器官组织,导致免疫细胞减少的结果^[19]。拘束应激明显减少脾脏和淋巴结内的淋巴细胞数,减少血清抗体 IgE、IgG1 及 IgG2 的产生,并显著降低脾脏及淋巴结内的 IL-4 和 IFN- γ 表达^[20]。急性拘束应激可以提高抗体反应水平,而慢性拘束应激则明显减弱这种反应能力,并认为细胞免疫对拘束应激的反应比体液免疫更为敏感^[21]。Bonneau 等发现拘束应激可以加快流感病毒感染小鼠体内病毒的复制,下降小鼠 T 淋巴细胞活性及减少 T 细胞中部分细胞因子的表达^[22]。他们在实验中确认拘束应激不仅影响 NK 细胞数量变化,同时也会降低其活性水平,会抑制免疫担当细胞内的 IL-12 及 IL-15 等细胞介素的表达^[23]。Connie 等证明拘束应激导致短尾猴 NK 细胞粘附分子 CD₂ 表达受损,继而抑制 NK 细胞杀伤活性^[24]。Kurihara 等在研究中确认拘束应激损伤机体 NK 细胞活性,从而明显增加 P815 瘤细胞负荷 DBA/2 小鼠的肝转移发生率^[6]。

持续的应激负荷可以显著影响能量代谢,从而导致部分生理机能低下和疲劳发生。拘束应激小鼠体内能量代谢紊乱,血糖和血脂的利用率下降,同时肠系膜脂肪组织中脂肪酶活性也显著降低^[25,26]。

也有一些研究证明拘束应激对心血管系统、生殖系统等机能产生明显影响。拘束应激能导致明显的心脏功能紊乱^[27]、可以导致小鼠血浆丙氨酸氨基转移酶明显升高,诱发肝炎发生^[28],拘束应激促使孕鼠黄体溶解,以致不能维持早

期妊娠而流产^[29]。

4 拘束负荷反应的制御与氧化应激状态

拘束负荷使动物产生综合的生理及病理性应激反应,传统观点认为引起应激效应的机制是由于交感神经兴奋和下丘脑-垂体-肾上腺功能反应,尤其是下丘脑释放促皮质素释放因子的中枢效应所致。Blalock 等认为在应激反应中,下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴起到了关键性的作用,而且提供了一个将神经信息转换成生理反应的模式^[34,30]。应激效应并非由某种单一的机制实现的,而是一个多系统参与调节的复杂过程。与神经内分泌及免疫系统及其相互作用有关。

氧化应激反应被认为是拘束负荷诱发组织损伤的可能机制之一。Madrigal 等的研究发现,拘束应激导致大鼠脑内谷胱苷肽水平降低、脂质过氧化和线粒体功能障碍。认为拘束负荷导致的氧化应激反应是损伤神经系统正常生理功能的原因之一^[31]。Nakamura 和 Gelderman 等的研究结果提示 NK 细胞和 T 细胞等免疫担当细胞对自由基反应敏感,容易受其作用失活从而影响机体免疫功能^[32,33]。Azlina 等在研究生育酚和生育三烯酸对大鼠束缚应激胃溃疡的保护作用时发现,拘束应激组大鼠的胃酸浓度和血清胃泌素浓度明显升高的同时,胃组织中丙二醛的含量显著上升,提示应激性胃损伤和氧化应激状态相关^[34]。郑洁静等在研究拘束应激诱发小鼠急性肝炎的过程也发现,小鼠肝脏的脂质过氧化产物明显增加,总抗氧化能力、维生素 C 及谷胱甘肽的含量明显下降,认为氧化应激是拘束负荷致肝损伤的原因之一^[28]。

5 拘束应激模型应用与展望

拘束应激反应在药理学、生理学及病理学研究等方面被广泛应用。目前,拘束应激模型除用于研究动物的应激反应外,更多的是被用于研究抗应激药物及中药对机体的调节作用。也可以用来检测包括抗抑郁药、抗精神病药物、抗焦虑剂以及影响去甲肾上腺素能、5-羟色胺能、多巴胺能、肽能等许多中枢神经系统药物的作用效果。

近年来,拘束应激模型已逐渐被广泛应用于中医药研究领域。唐己婷等认为利用拘束应激模型可以更好的理解中医“肝”的功能,并建议该动物模型可用于肝郁研究^[35]。可能有利于模拟或说明情志致病的部分过程。本研究室也在利用拘束应激模型探讨中药对应激小鼠免疫机能及体内过氧化状态的影响,旨在研究中药的“泻火”等作用^[18]。

拘束应激模型在国内外多年研究的基础上,已逐渐成为一种可重复、量化的实验模型。成为研究中药对体内环境调节作用及评价中药多层次、多靶点的整体作用的有效方法之一。

[参考文献]

[1] Bonfils S and Lambling A. Psychological factors and psychopharmacological actions in the restraint induced gastric ulcer [M]. In: Pathophysiology of Peptic Ulcer, edited by Skornya. S. C. Montreal: McGill University Press, 1963,

153-171.

[2] Brodie DA. Stress ulcers as an experimental model of peptic ulcer disease [M]. In: Peptic Ulcer, edited by C. J. Pfeiffer. Philadelphia: Lippincott, 1971, 71-83.

[3] Voitenko N N. Brain monoamine oxidase in highly aggressive C57BL and low aggressive CBA mice [J]. Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatel' nosti imeni I. P. Pavlova, 2004, 54(4): 519-525.

[4] Shvets VN and Davydov VV. Activities of the first line enzymes of antioxidant defence in the heart of rats of various age during short-term [J]. Immobilization Problemy Stareniya Dolgoletiya, 2006, 15(4): 301-309.

[5] Ida Y, Tanaka M, Tsuda, A. *et al.* Recovery of stress induced increases in noradrenaline turnover is delayed in specific brain regions of old rats [J]. Life Science, 1984, 34: 2357-2363.

[6] Kurihara H, Yao XS, Nagai H. Anti-stress effect of BRAND' s essence of chicken (BEC) on plasma glucose levels in mice loaded with restraint stress [J]. Journal of Health Science, 2006, 52(3): 252-8.

[7] Stackpole CA, Turner AI, Clarke IJ. *et al.* Seasonal differences in the effect of isolation and restraint stress on the luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone in hypothalamopituitary disconnected, gonadectomized rams and ewes [J]. Biology of Reproduction, 2003, 69(4): 1158-1164.

[8] 何蓉蓉, 栗原博, 姚新生, 等. 王老吉凉茶对应激小鼠免疫机能及体内过氧化状态的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 38-42.

[9] Nakamura K, Aoike A, Hosokawa T, *et al.* Effect of food-restriction stress on immune response in mice [J]. J. Neuroimmunol, 1990, 30, 23-29.

[10] Zhang X, Kindel GH, Wulfert E, *et al.* Effects of Immobilization Stress on Hippocampal Monoamine Release: Modification by Mivazerol, a new 2-Adrenoceptor Agonist [J]. Neuropharmacology, 1995, 35(12): 1661-1672.

[11] Henrik J, Ulrich K, Andreas K, *et al.* Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release [J]. Brain Research, 1998, 811: 10-20.

[12] Bonnin A, Grimaldi B, Fillion Mp, *et al.* Acute stress induces a differential increase of 5-HT-moduline LSAL tissue content in various rat brain areas [J]. Brain Research, 1999, 825: 152-160.

[13] Khan S, Michaud D, Moody TW, *et al.* Effects of acute restraint stress on endogenous adrenomedullin levels [J]. Neuroreport, 1999, 10(13): 2829-33.

[14] Chihiro SH, Toyota H, Kubota Y, *et al.* Effects of the

- acute and chronic restraint stresses on the central histaminergic neuron system of Fischer rat [J]. *Neuroscience Letters*, 1999, 262(2): 143-145.
- [15] Sahin E, and Gumuslu S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization/cold) [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2007, 34(5/6): 425-431.
- [16] Maki T, Katsumata H, Konishi S. I, *et al.* Corticotropin-releasing factor type-1 receptor mRNA is not induced in mouse hypothalamus by either stress or osmotic stimulation [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2003, 15(10): 916-924.
- [17] Sahin E and Guemueslue S. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology [J]. Toxicology & Pharmacology*, 2007, 144C(4): 342-347.
- [18] Ghizoni DM, and Alves P. Alterations in glutathione levels of brain structures caused by acute restraint stress and by nitric oxide synthase inhibition but not by intraspecific agonistic interaction [J]. *Behavioural Brain Research*, 2006, 166(1): 71-77.
- [19] Tarcic N, Ovadia H, Weiss DW, *et al.* Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 82(1): 40-46.
- [20] Fukui Y, Sudo N, Yu XN. The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 1997, 79: 211-217.
- [21] Millan S, Gonzalez-Quijano, Giordano M, *et al.* Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions [J]. *Life Sciences*, 1996, 59(17): 1431-1442.
- [22] Bonneau RH, Sheridan JF, Feng NG, *et al.* Stress-induced suppression of herpes simplex virus (HSV)-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection [J]. *Brain Behavior and Immunology*, 1991, 5: 170-192.
- [23] John H, David A, Patricia A, *et al.* Padgett Modulation of natural killer cell activity by restraint stress during an influenza A/PR8 infection in mice [J]. *Brain Behavior and Immunity*, 2004, 18: 526-535.
- [24] Connie JR, Cynthia S, William H, *et al.* Acute stress impairs NK cell adhesion and cytotoxicity through CD₂, but not LFA-1 [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 1999, 99: 230-241.
- [25] Kurihara H, Yao XS, Nagai H. Anti-stress effect of BRAND'S essence of chicken (BEC) on plasma glucose levels in mice loaded with restraint stress [J]. *Journal of Health Science*, 2006, 52(3): 252-258.
- [26] Kurihara H., Yao X. S., Nagai H. The protective effect of BRAND'S essence of chicken (BEC) on energy metabolic disorder in mice loaded with restraint stress [J]. *Journal of Health Science*, 2006, 52(1): 17-23.
- [27] Ueyama T, Ishikura F, Matsuda A, *et al.* Chronic estrogen supplementation following ovariectomy improves the emotional stress-induced cardiovascular responses by indirect action on the nervous system and by direct action on the heart [J]. *Circulation Journal*, 2007, 71(4): 565-573.
- [28] 郑洁静, 续洁琨, 栗原博, 等. 藤茶总黄酮对拘束负荷引起小鼠肝损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(10): 1249-1253.
- [29] Sugino N, Nakamura Y, Okuno N. Effects of restraint stress on luteal function in rats during mid-pregnancy [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1994, 101(1): 23-26.
- [30] Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems [J]. *Physiol Rev*, 1989, 69, 1-32.
- [31] Madrigal J, Olivenza R, Moro M, *et al.* Glutathione Depletion, Lipid Peroxidation and Mitochondrial Dysfunction Are Induced by Chronic Stress in Rat Brain [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 24(4): 420-29.
- [32] Nakamura K., Matsunaga K. Susceptibility of natural killer (NK) cells to reactive oxygen species (ROS) and their restoration by the minics of superoxide dismutase (SOD) [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 1998, 13(4): 275-90.
- [33] Gelderman KA, Hultqvist M, Holmberg J, *et al.* T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(34): 12831-12836.
- [34] Azlina MF, Nafeeza MI, Khalid BAK. A comparison between tocopherol and tocotrienol effects on gastric parameters in rats exposed to stress [J]. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 14(4): 358-65.
- [35] 唐已婷, 陈家旭. 束缚应激与中医肝的关系 [J]. *中国医药报*, 2002, 17(2): 82-83.