

单纯心理应激对 SD 大鼠行为及髁突软骨组织结构影响的实验研究

戴琳, 杨春

(昆明医科大学口腔医学院口腔解剖生理教研室, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 建立 SD 大鼠单纯心理应激的动物模型, 探讨单纯心理应激对 SD 大鼠颞下颌关节组织结构的影响, 为 TMD 的治疗提供基础研究. **方法** 选取 7 周龄雌性 SD 大鼠 54 只, 设立心理应激组、足部电击组 (不作为本实验的观察对象) 及空白对照组, 通过旁观电击实验建立 SD 大鼠单纯心理应激的动物模型, 采用旷场实验等方法观察其行为改变. 分别于实验后 1、3、5 周处死各组 SD 大鼠, 采用 HE 染色观察髁突软骨组织学改变. **结果** SD 大鼠单纯心理应激动物模型构建有效. 病理检查显示心理应激组 SD 大鼠髁突软骨发生了病理性改变, 其中心理应激组 II 最为严重, 表现为髁突软骨胶原纤维松解、断裂并形成大小不一的裂隙. **结论** 本研究所建立的 SD 大鼠单纯心理应激动物模型具备了良好的可行性及可重复性. 长期的单纯心理应激可导致 SD 大鼠颞下颌关节髁突软骨组织结构的改变.

[关键词] 单纯心理应激; SD 大鼠; 颞下颌关节; HE 染色

[中图分类号] R782.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 09 - 0001 - 06

Effect of Psychological Stress on Rat Behavior and Condylar Cartilage

DAI Lin, YANG Chun

(School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To establish the Sprague-Dawley rats psychological stress model and investigate the effect of the psychological stress on behavior and condylar cartilage of Sprague-Dawley rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided equally into psychological stress group, foot shock group and control group, and the foot shock group was only as sources of stimuli. The Sprague-Dawley rats psychological stress model was built, and the rats were killed at 1, 3 and 5 weeks respectively after stimulation. The behavior changes were observed by open field test, etc. The histology of condylar cartilage was observed by HE stain. **Results** Psychological stress model was effective in evaluating behavior changes. The pathological examination revealed structural changes of the condylar cartilage in the psychological stress group. The psychological stress group II was the most serious group with collagenous fibers disintegrated and gaps formed. **Conclusion** This rats model of the psychological stress shows great practicability and reproducibility. The long-term psychological stress can lead to SD rats behavior changes and temporomandibular joint condylar cartilage change.

[Key words] Psychological stress; Sprague-Dawley rats; Temporomandibular joints; HE stain

颞下颌关节紊乱病 (temporomandibular disorders, TMD) 是口腔颌面系统常见的疾病, 患病率在普通人群中达到了 20% ~ 40%^[1], 是指累及颞下颌关节和 (或) 咀嚼肌系统的具有疼痛、弹响、张口受限等相关症状的一组疾病的总称^[2]. 有报道称^[3], 人类主要疾病的 75% ~ 90% 与应激机制的激

活有关, 在目前已有的研究资料中, 许多学者认为, 咀嚼异常和心理精神对颞下颌关节 (temporomandibular joint, TMJ) 的影响较大. 随着现代社会飞速发展, 工作及生活节奏的加快以及竞争的加剧, 人们的心理压力也越来越大, 心理应激作为一种致病因素, 已受到了国内外学者的高度关注, 但

[基金项目] 云南省科技厅联合专项基金资助项目 (2011c175)

[作者简介] 戴琳 (1987~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事颞下颌关节病理研究工作.

[通讯作者] 杨春. E-mail: yangchun18@sina.com.

目前关于应激对口颌系统影响的研究较少。故本实验旨在建立 SD 大鼠单纯心理应激的动物模型, 探讨单纯心理应激对 SD 大鼠颞下颌关节组织结构的影响, 为 TMD 的治疗提供基础研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

6 周龄雌性 SD 大鼠 54 只 (昆明医科大学实验

动物中心提供), 实验前饲养 1~7 周龄, 以适应环境。动物随机分为心理应激组 (psychological stress group, PS 组)、足部电击组 (foot shock group, FS 组) 和空白对照组, 每组各 18 只, 各组再按照实验时间分为 1、3 和 5 周 3 个组 (表 1)。足部电击组 18 只 SD 大鼠仅作为心理应激组的应激源, 给予足部电击, 不作为本实验的观察对象。

表 1 实验动物分组

Tab. 1 Laboratory animal groups

组 别	处死时间		
	实验后 1 周 (8 周龄)	实验后 3 周 (10 周龄)	实验后 5 周 (12 周龄)
实验组			
心理应激组 (PS 组)	心理应激组 I 6 只	心理应激组 II 6 只	心理应激组 III 6 只
足部电击组 (FS 组)		18 只	
空白对照组	空白对照组 I 6 只	空白对照组 II 6 只	空白对照组 III 6 只

1.2 模型建立和方法

本实验在贾克然等^[4]所设计的 SD 大鼠心理应激交流箱的基础上进行了改进并制作 (图 1): SD 大鼠心理应激交流箱内部被透明有机玻璃板 (厚度: 3 mm) 分成了 24 个小室, 小室之间的有机玻璃板上刻有若干直径 2 mm, 间隔 5 mm 的小孔, 这样既可以防止 SD 大鼠之间发生身体接触, 又可以使其通过视觉、听觉、嗅觉获得临近 SD 大鼠的信息; 底部由市售的直径为 2.5 mm, 间隔 10 mm 的不锈钢导电丝组成, 通过稳压器 (TDGC2-0.5, 购于三科电器有限公司) 给交流箱底部的不锈钢导电丝通电, 心理应激组所处小室底部铺有厚度为 5 mm 的有机玻璃板; 心理应激交流箱外壁由厚度为 5 mm 的有机玻璃板构成, 其盖子上刻有直径 8 mm, 间隔 10 mm 的小孔。

SD 大鼠每天上午 9:00~10:00 准时接受刺激: 电压 30 V、通电 5 s、间隔 30 s、持续 30 min。为增强导电性, FS 组大鼠在接受刺激前足部先用生理盐水湿润, 实验前心理应激交流箱底部电阻丝刷生理盐水。

各组 SD 大鼠按照分组因素分别放入到相应的小室内 (图 2): FS 组大鼠放入底部导电的小室中, PS 组大鼠放入底部绝缘的小室中, 空白对照组 SD 大鼠处于与上述 SD 大鼠同样的心理应激交流箱小室内, 不接受任何信息。每只 PS 组大鼠周围至少有 2 只 FS 组大鼠相邻, 以保证其能接收到相邻 FS

组大鼠的信息, 如叫声、跳跃、竖毛、翘尾、粪便及尿的气味等, 空白对照组 SD 大鼠实验中不受以上任何应激的影响。

整个实验期间, 各组动物分开饲养, 饲养条件均相同: 自由进水和进食, 光照时间: 12 h/d。实验开始前 1 周, 将 SD 大鼠放入相应的心理应激交流箱小室中适应, 不给任何刺激, 使其适应环境。在实验 1、3、5 周结束时, 处死各组 SD 大鼠, 取标本, 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规脱水、石蜡包埋, 4 μ m 组织切片 HE 染色备用。

1.3 旷场实验

旷场实验箱是参考贾克然等^[4]所设计的进行制作 (图 3), 长、宽、高分别为 50 cm \times 50 cm \times 50 cm, 其内壁为黑色, 箱底方格为 5 cm \times 5 cm, 即底部分为了面积相同的 25 个方格, 黑白交错。

方法^[4,5]: 将 SD 大鼠放置于自制旷场实验箱的中央格, 然后用摄像系统记录其 3 min 内的活动情况。水平活动得分: SD 大鼠跨过 1 格则记为 1 分, 若其沿斜线行走, 则以每 5 cm 记为 1 分; 垂直活动得分: 以 SD 大鼠双足离开旷场实验箱底部为标志, 无论其站立多长时间, 以其放下双足记为 1 分。每次实验后清理干净 SD 大鼠留在箱内的尿液。采用盲法, 3 位观察者观察录像后评分, 一致性大于 0.95^[4]。

1.4 HE 染色

每组取 5 张厚度为 4 μ m 的切片进行常规苏木

素-伊红染色,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5 统计学处理

应用SPSS统计软件进行统计学分析,组间相同时段的比较采用成组 t 检验,组内不同时间段的比较采用完全随机设计资料的方差分析,两两比较采用SNK- q 检验,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物行为表现

PS组大鼠初次放入心理应激交流箱内,以鼻嗅四周,直立,探索欲望强。通电后,FS组大鼠尖叫、跳跃,PS组大鼠受其影响,竖毛、蜷缩、双眼微闭,处于恐惧状态。2组大鼠再次放入心理应激交流箱时,均抗拒进入。

2.2 体重

在整个实验期间,空白对照组大鼠,正常饮食,体重增长较快,而PS组大鼠饮食减少,体重增长速度减慢或出现负增长,与文献报道结果一

致^[6];但各实验组动物在饲养相同时间后比较,其体重无统计学差异($P>0.05$),见表2,图4。

2.3 旷场实验行为学测试

在心理应激1、3、5周后,各组SD大鼠进行旷场实验行为学测试并评分。PS组大鼠在受到刺激后,兴奋性增强且多停留或活动于外周区,实验后1、3周的水平活动评分和垂直活动评分均高于空白对照组,且心理应激组II水平活动评分和垂直活动评分高于心理应激组I($P<0.05$)。在心理应激组II旷场实验行为学测试后观察到SD大鼠出现了竖毛现象(表3、4)。

2.4 组织学观察

在光学显微镜下观察,空白对照组大鼠髌突表面光滑,延续性好,其胶原纤维排列与髌突关节面平行,纤维细胞位于其间,软骨结构正常,与人类的髌突软骨结构相似,其矢状切片呈“新月状”,层次清楚。心理应激组大鼠发生一定的病理改变,主要位于髌突表面(心理应激组:图5、7、9、10,空白对照组:图6、8、11)

表2 各组雌性SD大鼠实验前及实验后1、3、5周体重测量结果 [$(\bar{x}\pm s)$, g]

Tab. 2 The weight of rats in each period [$(\bar{x}\pm s)$, g]

组别	处死时间			
	实验前	实验后1周	实验后3周	实验后5周
心理应激组	169.40 \pm 6.14	180.43 \pm 7.41	190.81 \pm 16.00	214.76 \pm 9.26
空白对照组	172.63 \pm 7.07	186.28 \pm 12.78	205.52 \pm 16.30	227.75 \pm 7.14

组间相同时段的比较采用成组 t 检验,方差齐。

表3 各组雌性SD大鼠实验后1、3、5周旷场实验水平活动评分结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 The result of rats behavior detected by horizontal activity of open field test ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间		
	实验后1周	实验后3周	实验后5周
心理应激组	49.60 \pm 9.77	79.07 \pm 15.86*	77.67 \pm 37.88*
空白对照组	40.50 \pm 4.51	51.50 \pm 23.35	65.67 \pm 7.69

与实验后1周比较, * $P<0.05$ 。

表4 各组雌性SD大鼠实验后1、3、5周旷场实验垂直活动评分结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 4 The result of rats behavior detected by rearing score of open field test ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间		
	实验后1周	实验后3周	实验后5周
心理应激组	18.00 \pm 8.43	26.87 \pm 8.58*	29.80 \pm 10.80*
空白对照组	9.83 \pm 3.31	17.25 \pm 5.33	24.50 \pm 6.41*

与实验后1周比较, * $P<0.05$ 。



图 1 心理应激交流箱

Fig. 1 Psychological stress communication box



图 2 SD 大鼠心理应激交流箱示意图

Fig. 2 Sketch map of psychological stress communication box

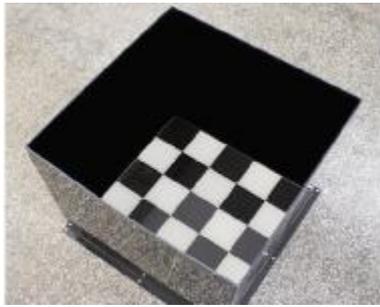


图 3 旷场实验箱

Fig. 3 Open field test box

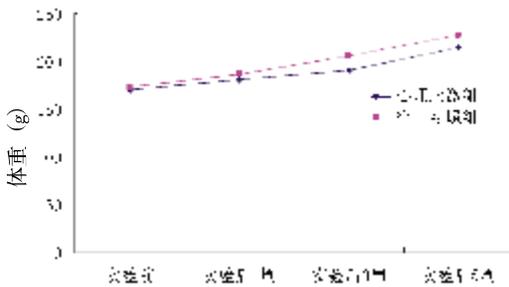


图 4 各组雌性 SD 大鼠实验前及实验后 1、3、5 周体重测量结果

Fig. 4 The weight of rats in each period

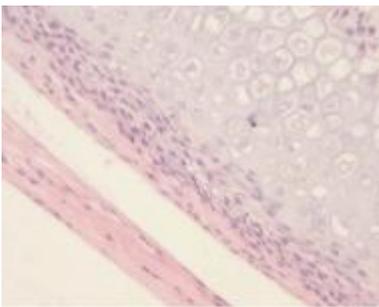


图 5 心理应激组 I (HE, 200x)

Fig. 5 Psychological stress group I (HE, 200x)

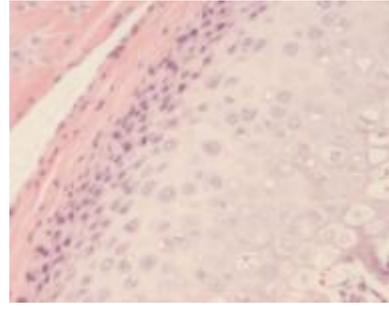


图 6 空白对照组 I (HE, 200x)

Fig. 6 Control rat group I (HE, 200x)

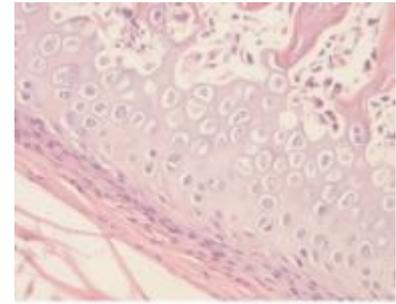


图 7 心理应激组 II (HE, 200x)

Fig. 7 Psychological stress group II (HE, 200x)

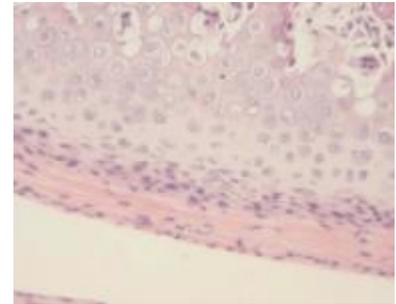


图 8 空白对照组 II (HE, 200x)

Fig. 8 Control rat group II (HE, 200x)

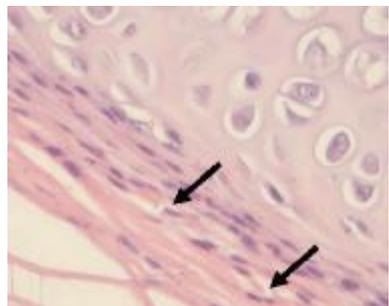


图 9 心理应激组 II (HE, 400x)

Fig. 9 Psychological stress group II (HE, 400x)

注箭头所示为髁突表面胶原纤维松解更为厉害, 且断裂并形成大小不一的裂隙.

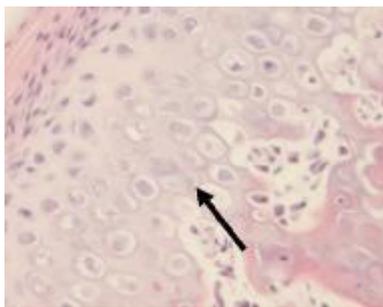


图10 心理应激组Ⅲ (HE, 200×)

Fig. 10 Psychological stress group III (HE, 200×)

注: 箭头所示表面胶原纤维松解

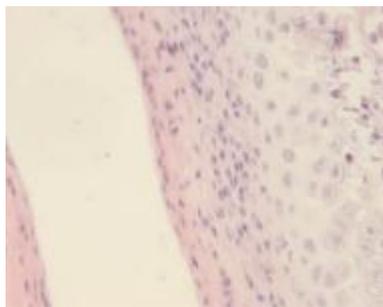


图11 空白对照组Ⅲ (HE, 200×)

Fig. 11 Control rat group III (HE, 200×)

3 讨论

心理应激与疾病之间有着密切的关系, 强烈的心理应激或者长期慢性的心理应激对某些疾病的发生、发展和转归都有着重要的影响^[6]. 一个好的心理应激动物模型为研究应激与人类各种疾病之间的联系提供了重要的客观依据.

心理应激交流箱最早是 Ogawa 和 Kuwabara 设计的^[7], 实验时通过 SD 大鼠心理应激交流箱将 PS 组大鼠与 FS 组大鼠分开, 建立了 SD 大鼠单纯心理应激的动物模型. FS 组大鼠在受到电刺激后, 即出现尖叫、奔跑、排泄物增多等现象, PS 组大鼠处于邻近小室内可以观察到同类的这些表现, 然后出现了身体蜷缩、微闭双眼、竖毛等现象, 显示其处于高度的紧张、焦虑和抑郁状态^[8]. 整个实验过程中, 心理应激组 SD 大鼠除接受到上述情绪刺激外, 没有受到其他的应激因素的影响, 是个较好的情绪应激动物模型.

体重是个积累变量, 一般不会在短时间内剧烈变化, 但大鼠的体重增长趋势的变化可以反映出大鼠精神状态的变化情况^[9]. 长期慢性的心理应激, 使 PS 组大鼠一直处于紧张、惊恐和焦虑的状态下, 导致其体重增长缓慢, 个别 SD 大鼠体重甚至出现了负增长, 这与人类慢性心理社会应激后表现出的

体重变化有很大程度的相似性.

在应激动物模型的评价方面, 目前的报道中尚没有金标准, 而旷场实验在精神学科中是常用的评价方法, 也是比较成熟和受到国内外学者们公认的^[10]. 旷场实验为非条件反射模型, 分为水平活动和垂直活动评分: 水平活动得分即动物跨格数, 反应动物的兴奋性; 垂直活动得分即动物站立次数, 反映动物对周围环境的不确定性和探究趋势^[11]. 实验时将 SD 大鼠置于旷场实验箱的中央格, 然后在一定的时间内观察其活动的情况, 中心区域对动物来说具有一定的新奇性同时是潜在的威胁情境, 而外周区则相对安全, 因此, 如果动物的焦虑水平高则倾向于停留在外周区, 反之, 对中央区的探究次数及时间就会增加^[12]. 实验中, 各时间点的 PS 组 SD 大鼠均比空白对照组 SD 大鼠更多的停留或活动于外周区, 可能说明其焦虑水平较高. 1、3 周 PS 组 SD 大鼠的水平活动得分和垂直活动得分均高于空白对照组, 说明心理应激后的 SD 大鼠的兴奋性和敏感性增强, 对周围环境的不确定性和探究活动增多, 且心理应激组 II 水平活动评分和垂直活动评分高于心理应激组 I, 可能说明随着刺激时间的延长, SD 大鼠的兴奋性、敏感性及焦虑水平会有所增加. 而 5 周 PS 组 SD 大鼠水平活动得分和垂直活动得分与空白对照组相比无统计学差异, 可能是由于长时间的应激使 PS 组 SD 大鼠对外界刺激产生了适应性. 另外在心理应激组 II 进行旷场实验后还观察到 SD 大鼠出现了竖毛现象, 该现象可能也提示了持续的心理应激使得 3 周 PS 组 SD 大鼠更为紧张, 其焦虑水平较 1 周 PS 组 SD 大鼠更高.

心理应激对 TMJ 的影响, 国内外报道均较少. 本实验所建立的单纯心理应激模型使实验 SD 大鼠长期处于高强度的紧张和抑郁状态下, 使得大鼠 TMJ 的结构发生了变化, 因此认为如果应激的强度和时间的延长, 超过了 TMJ 自身代偿的能力, 就会造成病理性负荷, 从而影响 TMJ 的功能及代谢, 直至损伤. 在实验中笔者看到, 随着心理应激时间的延长, TMJ 的结构发生改变, 其中心理应激组 II 的病变最为严重, 髌突表面胶原纤维松解最厉害, 且断裂并形成大小不一的裂隙. 而心理应激组 III 相对于心理应激组 II 有所减轻, 该结果与吴高义等^[13]的研究结果一致, 这说明单纯心理应激确实会对 TMJ 的结构造成影响, 在应激强度不变的情况下, 随着时间的延长, TMJ 的病变会加重, 但是在此过程中, 实验动物会对外界刺激产生适应性, 可能导致 TMJ 的病变出现一定程度的

修复.

本实验成功建立了 SD 大鼠单纯心理应激的动物模型, 该建模方法中 SD 大鼠能较好的耐受, 并具有很好的可重复性, 成功率高, 是一种可靠的单纯心理应激模型的建立方法.

通过建立 SD 大鼠单纯心理应激的动物模型, 为下一步研究单纯心理应激对 SD 大鼠颞下颌关节髁突软骨的影响提供了实验基础.

[参考文献]

- [1] 马绪臣. 颞下颌关节病的基础与治疗[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,2004:38-47.
- [2] OKESON J P. Orofacial pain:guidelines for assessment, diagnosis, and management [M]. Chicago:Quint essence, 1996:131-134.
- [3] LANDI N, LOMBARDI I, MANFREDINI D, et al. Sexual hormone serum levels and temporomandibular disorders:a preliminary study [J]. Gynecol Endocrinol, 2005, 20(2): 99-103.
- [4] 贾克然, 郭刚, 刘开云, 等. 单纯心理应激小鼠模型的建立及对行为、内分泌免疫功能的影响[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(3):329-332.
- [5] 肖朋, 张丽, 侯敏, 等. 心理应激对大鼠颞下颌关节组织结构的影响[J]. 科技导报, 2010, 28(1):32-36.
- [6] BALL T M. Cortisol circadian rhythm and stress responses in infants an risk of allergic disease [J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13(5/6):294-300.
- [7] ENDO Y, YAMAUCHI K, FUETA Y, et al. Changes of body temperature and plasma corticosterone level in rats during psychological stress induced by the communication box [J]. Med Sci Monit, 2001, 7(6):1 161-1 165.
- [8] 尚海燕, 陈永进, 吴高义, 等. 情绪应激对大鼠咬肌超微结构的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(4): 198-201.
- [9] 梁军, 陈燕, 胡敏, 等. 慢性不可预知性应激刺激建立大鼠颞下颌关节紊乱病模型 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(1):11-14.
- [10] 肖朋, 刘海霞, 王兵. 大鼠心理应激状态与咬肌活动性的关系[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(5):502-506.
- [11] 邓颖. 情绪应激动物模型的建立及评估[J]. 华西医学, 2007, 22(4):902-903.
- [12] 亓晓丽, 林文娟. 焦虑和抑郁动物模型的研究方法和策略[J]. 心理科学进展, 2005, 13(3):327-332.
- [13] 吴高义, 陈永进, 陈磊, 等. 心理应激后大鼠颞下颌关节系统的病理性改变[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(6):841-844.

(2013-04-15 收稿)

声 明

近期发现有网站盗用《昆明医科大学学报》的名义征集稿件、征收版面费, 造成了极其恶劣的影响, 严重地损害了本刊的声誉。《昆明医科大学学报》编辑部为此提醒广大读者、作者提高警惕, 以免上当受骗, 切勿将钱汇到任何个人账户, 否则后果自负。本刊版面费和审稿费汇款地址: 昆明市呈贡新城雨花街道春融西路 1168 号, 《昆明医科大学学报》编辑部收。邮编: 650500 电话: 0871-65936489 或 0871-65333437. 网上投稿系统网址: <http://kmykdx.cnjournals.cn>

《昆明医科大学学报》编辑部

2013 年 4 月 11 日