

研究论文

间歇性低氧预处理对创伤后应激障碍模型小鼠恐惧和焦虑行为的改善作用

丁伏生^{1,2}, 成祥², 赵彤², 赵永歧², 张广波², 吴海涛², 朱玲玲^{2,*}, 吴奎武^{1,2,*}

¹安徽医科大学研究生院, 合肥 230023; ²军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850

摘要: 间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)对高血压、心肌梗死、脑缺血以及抑郁症有一定预防和治疗作用, 但IH对创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder, PTSD)的作用尚不清楚。本研究采用不可逃避足底电击联合场景再现制备PTSD小鼠模型, 通过旷场测试、高架十字迷宫测试及条件性恐惧测试反映其恐惧和焦虑水平; 通过Y迷宫测试反映其空间记忆能力; 通过免疫组化染色检测海马、杏仁核和内侧前额叶皮层Fos阳性神经元的数量; 采用Western blot方法检测海马、杏仁核和内侧前额叶皮层低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)蛋白表达水平。结果显示, IH与模型(电击)对高架十字迷宫测试中进入开放臂次数所占百分比、条件性恐惧测试中僵住时间和排便数量存在交互作用, IH能增加PTSD模型小鼠在高架十字迷宫中开放臂运动次数, 减少条件性恐惧测试中僵住时间和排便数量。同时, IH预处理能减少PTSD模型小鼠海马、杏仁核和内侧前额叶皮层Fos阳性神经元的数量, 增加这些脑组织中HIF-1 α 、VEGF和BDNF蛋白的表达水平。以上结果表明, IH预处理对PTSD模型小鼠恐惧和焦虑行为有改善作用, 提示IH有可能成为预防PTSD的有效手段。

关键词: 创伤后应激障碍; 间歇性低氧预处理; Fos阳性神经元; 低氧诱导因子1 α ; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R749.99

Intermittent hypoxic preconditioning relieves fear and anxiety behavior in post-traumatic stress model mice

DING Fu-Sheng^{1,2}, CHENG Xiang², ZHAO Tong², ZHAO Yong-Qi², ZHANG Guang-Bo², WU Hai-Tao², ZHU Ling-Ling^{2,*}, WU Kui-Wu^{1,2,*}

¹Graduate School of Anhui Medical University, Hefei 230023, China; ²Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Intermittent hypoxia (IH) has preventive and therapeutic effects on hypertension, myocardial infarction, cerebral ischemia and depression, but its effect on post-traumatic stress disorder (PTSD) has not been known. In this study, we used inescapable electric foot shock combined with context recapture to build PTSD mouse model. The levels of fear and anxiety were valued by the open field, the elevated plus maze (EPM) and the fear conditioning tests; the level of spatial memory was valued by Y maze test; the number of Fos positive neurons in hippocampus, amygdala and medial prefrontal cortex was valued by immunohistochemical staining; and the protein expressions of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in these brain area were valued by Western blot. The results showed that IH and model (foot shock) had an interaction on percentage of entering open arms (OE%) in EPM and freezing time and the number of fecal pellets in fear conditioning

Received 2019-01-11 Accepted 2019-03-14

This work was supported by a grant from the Beijing Municipal Science and Technology Commission, China (No. Z16110000216134).

*Corresponding authors. ZHU Ling-Ling, Tel: +86-10-66931315; E-mail: linglingzhuamms@126.com; WU Kui-Wu, Tel: +86-10-66932333; E-mail: ammswu@sina.com

test. IH increased OE% in EPM and reduced the freezing time and the number of fecal pellets in fear conditioning test in PTSD model mice. At the same time, IH reduced the number of Fos positive neurons in the hippocampus, amygdala and medial prefrontal cortex of PTSD model mice, and increased the protein expression levels of HIF-1 α , VEGF and BDNF in these brain tissues. In conclusion, IH pretreatment can relieve fear and anxiety behavior in post-traumatic stress model mice, suggesting that IH may be an effective means of preventing PTSD.

Key words: post-traumatic stress disorder; intermittent hypoxic preconditioning; Fos positive neurons; HIF-1 α ; BDNF

创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD) 是个体遭受异乎寻常的威胁性或灾难性心理创伤而诱发的长期持续的精神障碍。目前对其具体发病机制还没有完全研究清楚, 治疗方法主要以心理治疗和药物治疗为主。药物主要包括抗抑郁的 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 再摄取抑制剂 (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) 类, 抗焦虑的苯二氮唑类以及调节下丘脑 - 垂体 - 肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴的糖皮质激素类。但是, 这些药物虽然能缓解症状, 但起效慢、有效率低, 容易产生依赖性, 有的还会有一系列毒副作用^[1, 2]。因此, 亟需寻找更多安全有效的预防和治疗 PTSD 的方法。

间歇性低氧 (intermittent hypoxia, IH) 是指人或动物间断性暴露于一定程度的低氧环境。它的概念范围很广, 包括阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea, OSA)、高原训练等^[3]。早在 20 世纪 30 年代, 前苏联科学家就提出了“低氧训练”的概念, 并报道 IH 对心脑血管疾病、支气管哮喘、糖尿病、帕金森病等一系列疾病有治疗作用^[4]。西方科学家已将 IH 应用于运动员的训练及高原适应^[5, 6]。低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是低氧调控中最关键的核转录调控因子, 它包括 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基, 其中 HIF-1 α 是它的活性亚基。在常氧下, HIF-1 α 被蛋白酶体降解, 而在低氧环境下, 这种降解作用被抑制, HIF-1 α 和 HIF-1 β 形成异源二聚体 HIF-1, 并转移到核内, 与转录辅助因子 P300/CBP 相互作用, 结合低氧反应元件 (hypoxic response element, HRE), 激活其下游一系列靶基因如红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 从而促进机体对低氧环境的适应^[7, 8]。另外, 最近有研究报道, IH 对抑郁模型小鼠有一定的保护作用, 其机制与 IH 促进海马源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达、增加海马的神经发生有关^[9, 10]。

但有关 IH 对 PTSD 是否有预防和治疗作用尚未见报道。本研究旨在检测 IH 对 PTSD 小鼠恐惧和焦虑行为的影响, 并初步探讨其作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验药品、试剂以及主要仪器 HIF-1 α 抗体 (Gene Tax 公司, GTX127309), VEGF 抗体 (ABclonal 公司, A12303), BDNF 抗体 (ABclonal 公司, A10760), β -actin 抗体 (Sigma 公司), Fos 抗体 (Abcam 公司, ab208942), 低压低氧实验动物舱 (DYC-DWY, 贵州风雷航空军械有限责任公司), 动物无创生理指标测量仪 (美国 STARR 公司), 条件性恐惧设备箱 (Ugo basile 公司), ANY-maze 动物行为分析系统 (美国 Stoeling 公司), 脱水机 (武汉俊杰电子有限公司), 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司), 石蜡切片机 (上海徠卡仪器有限公司), 其他常用化学试剂和实验器材均购自军事医学研究院试剂库及条件处。

1.2 实验动物及分组 健康、雄性 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 8~10 周龄, 购自北京维通利华生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0006。实验前将小鼠适应性喂养 1 周, 小鼠饲养于恒温 [(22 \pm 2) $^{\circ}$ C]、昼夜节律 12 h/12 h 的动物室中。将小鼠按体重随机分成 4 组, 分别为对照组、IH 组、模型组 (FS)、IH 预处理的模型组 (IH+FS), 每组 8~10 只。所有的实验动物管理遵守中华人民共和国国家卫生健康委员会《实验动物管理条例》和军事医学研究院实验动物管理条例。

1.3 实验流程 如图 1 所示, IH 处理 2 周, 进行生理指标及血常规的检测, 通过足底电击建立 PTSD 模型, 然后进行行为学测试、免疫组织化学染色及 Western blot 检测。

1.4 IH 预处理^[11] 将 IH 预处理组小鼠放入低压低氧透明动物实验舱进行 IH 预处理。具体模型如下: 每天固定时间 (上午 10:30) 将小鼠放入低氧舱内, 以 10~20 m/s 的速度上升, 15 min 内将舱内模拟海拔高度由 0 m 升高至 3 000 m (舱内氧浓度:

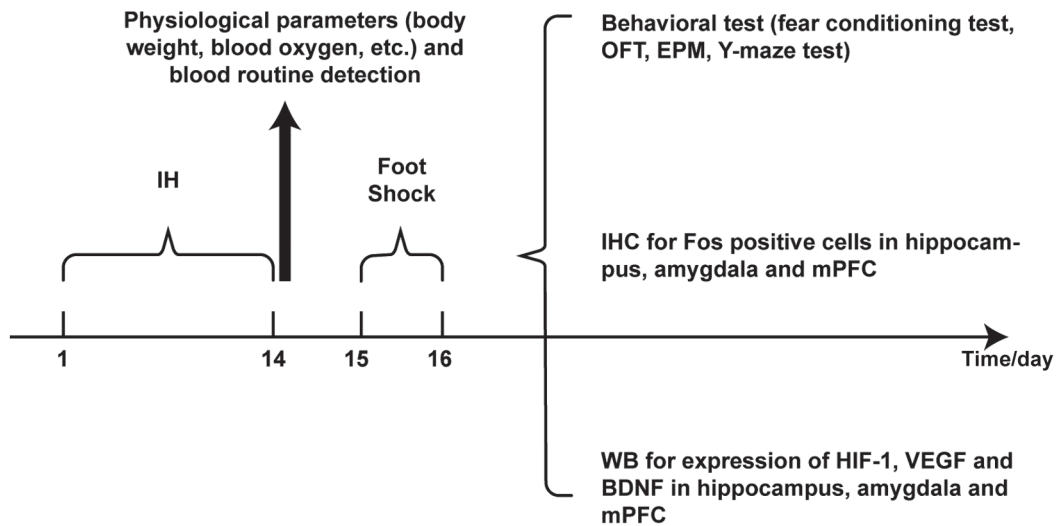


图 1. 实验流程图

Fig. 1. Experimental flow chart. IH: intermittent hypoxia; OFT: open field test; EPM: elevated plus maze; IHC: immunohistochemistry; WB: Western blot.

14.2% O₂；氧分压 = 108.8 mmHg；大气压 = 525 mmHg)，处理 4 h 后降舱，取出动物于正常环境下饲养，共持续 14 天。动物实验舱的湿度保持在 40%~50%，温度保持在 22~24 °C。对照组和 FS 组小鼠不做任何处理，在一般环境下正常饲养两周。

1.5 小鼠生理指标的检测 小鼠麻醉后，用宠物电推剪和脱毛膏小心将小鼠颈部毛去除干净，露出裸露的白色皮肤。把合适大小的传感器装置夹在小鼠颈部，打开软件设置好参数，仪器可自动监测小鼠动脉氧饱和度、呼吸频率及心率，待数值稳定后，可记录监测数据。

1.6 小鼠血常规的检测 小鼠麻醉后，眼球取血，用提前准备好的抗凝试管收集 50 μL 以上血液，2 h 内送检，由武汉谷歌生物技术有限公司提供小鼠血常规检测服务。

1.7 PTSD 模型小鼠的制备^[12] 足底不可逃避的电流刺激连续 2 天（小鼠在电击箱适应 5 min 后，给予电流强度为 0.8 mA 的足底电击，电击 15 次，持续 10 s，间隔 10 s）；正常对照组小鼠置于电击箱中 10 min，不给予任何刺激。

1.8 行为学实验 行为学实验包括条件性恐惧测试、旷场测试、高架十字迷宫测试和 Y 迷宫测试。所有行为学测试之前将小鼠放入实验环境适应 30~60 min，实验过程中注意避免声音和强光对小鼠的干扰。每只小鼠实验完成后用 75% 的医用酒精擦拭干净小鼠粪便及尿液，以免对下一只小鼠的

行为造成影响。

1.8.1 条件性恐惧测试 将小鼠放入电击箱中，不给予任何刺激，用 AMY-maze 软件记录其 5 min 僵住时间（除呼吸外其他肌肉活动消失的时间），并手工记录实验过程中小鼠在该环境下的排便数量。僵住时间主要反映小鼠重新接触刺激环境的条件恐惧，而排便数量在一定程度上可以反映小鼠的恐惧和焦虑情绪。

1.8.2 旷场测试 小鼠旷场箱为 40 cm × 40 cm × 40 cm 的正方体，四周内壁为黑色，底面为白色。底面平均分为 25 (5 × 5) 个小方格，将中间 16 个定义为中央区域，周围 9 个定义为周围区域。实验开始时，将小鼠从旷场箱的中心慢慢放入，用 AMY-maze 软件观察并记录小鼠 5 min 内的活动情况，同时统计分析小鼠进入旷场中央区域的次数、时间与距离（以小鼠的躯干中心进入中央区域为准）。

1.8.3 高架十字迷宫测试 小鼠高架十字迷宫由两条开放臂和两条闭合臂组成：开放臂长 33 cm，宽 5 cm，周围没有遮挡；闭合臂长 30 cm，宽 6 cm，周围有高 20 cm 的隔板遮挡；开放臂与闭合臂之间呈 90 度夹角，开放臂与闭合臂连接部分为 5 cm × 5 cm 区域，称之为中央区域，整个迷宫离地约 40 cm。实验开始时，将小鼠面朝开放臂的方向，放入中央区域，用 AMY-maze 软件观察并记录 5 min 内小鼠进入开放臂和闭合臂的次数 (open-arm entries, OE; close-arm entries, CE) 与时间 (open-arm

time, OT; close-arm time, CT)(以小鼠躯干中心进入为准), 然后计算进入开放臂次数所占百分比(OE%) = $OE/(OE + CE) \times 100\%$ 以及在开放臂运动时间所占百分比(OT%) = $OT/(OT + CT) \times 100\%$ 。

1.8.4 Y 迷宫测试 小鼠 Y 迷宫实验装置由夹角为 120° 的 3 个支臂组成, 分别定义为 A、B 和 C 臂, 每个支臂长 35 cm, 宽 8 cm, 周围均有高为 15 cm 塑料的遮挡。实验时将小鼠由 A 臂的末端放入(头朝内), 容许其自由进出 3 个臂。用 AMY-maze 软件记录 5 min 内小鼠进臂总次数(N)及进臂顺序。小鼠连续进入 3 个不同的臂被定义为 1 次正确交替反应, 记录正确交替反应次数(number of alternation), 用自发交替反应率(alternation behavior)反映小鼠空间工作记忆能力。计算公式为: 自发交替反应率 = 正确交替反应次数 / (N - 2)。

1.9 免疫组织化学方法检测相关脑区 Fos 阳性神经元的数量 行为学实验结束后 90 min 左右, 每组取 3 只小鼠进行麻醉, 进行心脏灌流, 取脑, 后固定过夜, 常规石蜡包埋, 制作石蜡切片, 并进行免疫组织化学染色。具体实验步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水, 用柠檬酸抗原修复缓冲液(pH = 6.0)进行抗原修复, 阻断内源性过氧化物酶, 血清封闭 30 min, 加一抗(Fos 抗体)孵育过夜, 加二抗室温孵育 50 min, DAB 显色, 脱水封片, 显微镜镜检, DAB 显出的阳性表达为棕黄色, 拍照, 并用 IPP 软件进行计数。每组取一张脑片孵育 PBS (不加一抗)过夜, 其他步骤相同, 作为阴性对照。

1.10 Western blot 法检测小鼠相关脑区 HIF-1 α 、VEGF、BDNF 蛋白水平 行为学实验结束后 1 d, 每组取 4 只小鼠分离新鲜海马、杏仁核、内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC), 用 RIPA 裂解液(含 2% 蛋白酶抑制剂)裂解组织, 4°C 离心后取上清定量, 制备蛋白上样缓冲样品, 然后按 Western blot 常规步骤进行电泳 - 电转 - 封闭 - 一抗 - 二抗 - 显影。主要一抗稀释比例: HIF-1 α 、VEGF、BDNF: 1:1 000; β -actin: 1:20 000, 二抗稀释比例为: HIF-1 α 、VEGF、BDNF: 1:2 000, β -actin: 1:3 000。自动显影后, 用 Image J 软件分析计算 HIF-1 α / β -actin、VEGF/ β -actin、BDNF/ β -actin 的相对值, 并进行统计分析。

1.11 统计学分析 实验数据以 mean \pm SEM 表示。采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行统计学分析, 采用双因素方差分析(two-way ANOVA), 两两

比较采用 Bonferroni 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IH 处理对小鼠生理指标及血常规的影响

与对照组相比, IH 组小鼠体重增量和血氧饱和度有所减少, 心率和呼吸频率有所增加, 但差异均没有统计学意义(表 1); 血细胞分析结果显示: 白细胞参数和血小板参数, 两组之间的差异没有统计学意义; IH 组红细胞各参数均高于对照组, 且红细胞数目、血红蛋白含量、红细胞压积和平均红细胞血红蛋白含量这 4 个指标上, 两组差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。以上结果说明, IH 能使促进机体红细胞及血红蛋白的生成, 以提高氧气的运输及摄取能力, 从而更好地适应低氧环境。

2.2 IH 预处理减轻 PTSD 模型小鼠恐惧和焦虑行为

条件性恐惧实验的双因素方差分析结果显示: 模型(电击)对小鼠僵住时间($F = 83.34, P < 0.01$)和排便数量($F = 15.78, P < 0.01$)有显著影响, IH 对这两个指标的也有显著性影响(僵住时间: $F = 5.54, P < 0.05$; 排便数量: $F = 4.19, P < 0.05$)。另外, 两个因素对僵住时间这个指标交互作用明显($F = 4.78, P < 0.05$)。组间两两比较表明, 模型组僵住时间和排便数量明显高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 而 IH 预处理的模型组僵住时间和排便数量低于模型组, 差异也具有统计学意义($P < 0.05$)(图 2A、B)。

旷场实验的双因素方差分析结果显示: 模型(电击)对小鼠运动距离($F = 22.37, P < 0.01$)、进入中央区域次数($F = 18.70, P < 0.01$)、中央区域运动的时间($F = 27.16, P < 0.01$)以及中央区域运动的距离($F = 28.89, P < 0.01$)均有显著性影响, IH 对这些指标影响均不显著(运动距离: $F = 0.01, P = 0.01$;

表 1. 间歇性低氧对小鼠生理指标的影响

Table 1. The physiological parameters in mice after intermittent hypoxia treatment

Parameters	CON	IH
Weight increment (g)	2.24 \pm 0.09	2.13 \pm 0.12
Heart rate (beats/min)	418.8 \pm 23.6	423.4 \pm 23.5
Breath rate (breaths/min)	137.0 \pm 6.6	139.9 \pm 6.6
Blood oxygen saturation (%)	97.06 \pm 0.67	95.18 \pm 0.96

Mean \pm SEM, $n = 8$. CON: control group; IH: intermittent hypoxia group.

表2. 间歇性低氧对小鼠血常规的影响

Table 2. The blood routine in mice after intermittent hypoxia

Parameters	CON	IH
WBC# ($\times 10^9/L$)	4.24 \pm 0.47	4.00 \pm 0.66
Lymph# ($\times 10^9/L$)	3.53 \pm 0.37	3.56 \pm 0.54
Mon# ($\times 10^9/L$)	0.16 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03
Gran# ($\times 10^9/L$)	0.96 \pm 0.13	0.98 \pm 0.18
Lymph% ($\times 10^9/L$)	68.26 \pm 1.80	62.49 \pm 4.50
Mon% (%)	4.04 \pm 0.35	4.06 \pm 0.43
Gran% (%)	27.70 \pm 1.49	28.05 \pm 2.53
RBC ($\times 10^{12}/L$)	8.06 \pm 0.30	8.80 \pm 0.16*
HGB (g/L)	123.4 \pm 3.2	134.0 \pm 3.4*
HCT (%)	40.24 \pm 1.48	44.38 \pm 1.0*
MCV (fL)	47.44 \pm 0.32	47.86 \pm 1.60
MCH (pg)	14.85 \pm 0.08	15.33 \pm 0.15*
MCHC (g/L)	311.30 \pm 1.85	311.50 \pm 1.40
RDW (%)	15.46 \pm 0.21	15.74 \pm 0.30
PLT ($\times 10^9/L$)	1 354 \pm 52.25	1 387 \pm 49.69
MPV (fL)	5.99 \pm 0.12	5.61 \pm 0.34
PDW	16.24 \pm 0.03	16.46 \pm 0.13
PCT (%)	0.45 \pm 0.07	0.47 \pm 0.07

CON: control group; IH: intermittent hypoxia group; WBC#: white blood cell count; Lymph#: lymphocyte count; Mon#: monocyte count; Gran#: granulocyte count; Lymph%: percentage of lymphocytes; Mon%: percentage of monocytes; Gran%: percentage of granulocyte; RBC: red blood cell; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width; PLT: platelets; MPV: mean platelet volume; PDW: platelet distribution width; PCT: plateletcrit. Mean \pm SEM, $n = 8$. * $P < 0.05$ vs CON group.

进入中央区域次数: $F = 0.85$, $P = 0.36$; 中央区域运动的时间: $F = 0.38$, $P = 0.54$; 中央区域运动的距离: $F = 0.14$, $P = 0.71$), 这两个因素之间交互作用也不显著(运动距离: $F = 0.04$, $P = 0.85$; 进入中央区域次数: $F = 0.40$, $P = 0.53$; 中央区域运动的时间: $F = 1.82$, $P = 0.19$; 中央区域运动的距离: $F = 0.28$, $P = 0.60$)。组间两两比较表明, 与对照组相比, 模型组小鼠运动距离、进入中央区域次数、中央区域运动的时间以及中央区域运动的距离均有所减少, 且差异具有统计学意义($P < 0.01$)(图2C~F)。

高架十字迷宫实验的双因素方差分析结果显示: 模型(电击)对小鼠 OE% ($F = 16.18$, $P < 0.01$) 和 OT% ($F = 14.37$, $P < 0.01$) 均有显著影响。IH 对

这些指标影响均不显著(OE%: $F = 2.67$, $P = 0.11$; OT%: $F = 0.14$, $P = 0.71$)。在 OE% 指标上, 这两个因素之间交互作用显著($F = 5.37$, $P < 0.05$)。组间两两比较表明, 相对于对照组, 模型组小鼠 OE% 和 OT% 明显减少, 且差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相对于模型组, IH 预处理的模型组 OE% 和 OT% 有所增加, 且 OE% 指标差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 2G、H)。

Y 迷宫实验的双因素方差分析结果显示: 模型(电击)对小鼠进入臂的总次数($F = 0.03$, $P = 0.84$) 和自发交替反应率($F = 0.42$, $P = 0.52$) 影响均不显著, IH 对这些指标影响也不显著(进入臂的总次数: $F = 0.98$, $P = 0.33$; 自发交替反应率: $F = 0.07$, $P = 0.79$), 两因素之间交互作用不明显(进入臂的总次数: $F = 0.56$, $P = 0.46$; 自发交替反应率: $F = 1.12$, $P = 0.30$)(图 2I、J)。

2.3 IH预处理减少PTSD模型小鼠脑组织中Fos阳性神经元数量

双因素方差分析结果显示, 模型(电击)对海马各亚区(CA1 区, CA3 区, DG 区)、杏仁核和 mPFC 脑区 Fos 阳性神经元表达均影响显著(CA1 区: $F = 35.03$, $P < 0.01$; CA3 区: $F = 31.82$, $P < 0.01$; DG 区: $F = 49.84$, $P < 0.01$; 杏仁核: $F = 120.6$, $P < 0.01$; mPFC: $F = 18.03$, $P < 0.01$); IH 对海马中 Fos 阳性神经元表达影响不显著(CA1 区: $F = 1.14$, $P = 0.24$; CA3 区: $F = 3.04$, $P = 0.09$; DG 区: $F = 2.21$, $P = 0.15$), 但对杏仁核和 mPFC 中 Fos 阳性神经元表达影响显著(杏仁核: $F = 5.74$, $P < 0.05$, mPFC: $F = 4.93$, $P < 0.05$); 在杏仁核和海马 DG 区, 模型(电击)和 IH 这两个因素交互作用明显(DG 区: $F = 10.37$, $P < 0.01$; 杏仁核: $F = 8.19$, $P < 0.01$)。组间两两分析结果显示, 模型组相比于对照组, 这三个脑区 Fos 阳性神经元表达明显增加, 且差异具有统计学意义($P < 0.01$); 而 IH 预处理的模型组相对于模型组, 三个脑区 Fos 阳性神经元表达均有所减少, 且在海马 DG 区、杏仁核和 mPFC 中, 差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图 3)。

2.4 IH预处理增加PTSD模型小鼠脑组织中HIF-1 α 、VEGF及BDNF蛋白水平

海马脑区的双因素方差分析结果显示: 模型(电击)对 HIF-1 α 蛋白表达没有作用, IH 对 HIF-1 α 蛋白表达有明显影响($F = 43.72$, $P < 0.01$), 但这两个因素之间交互作用不显著($F = 0.30$, $P = 0.59$)(图

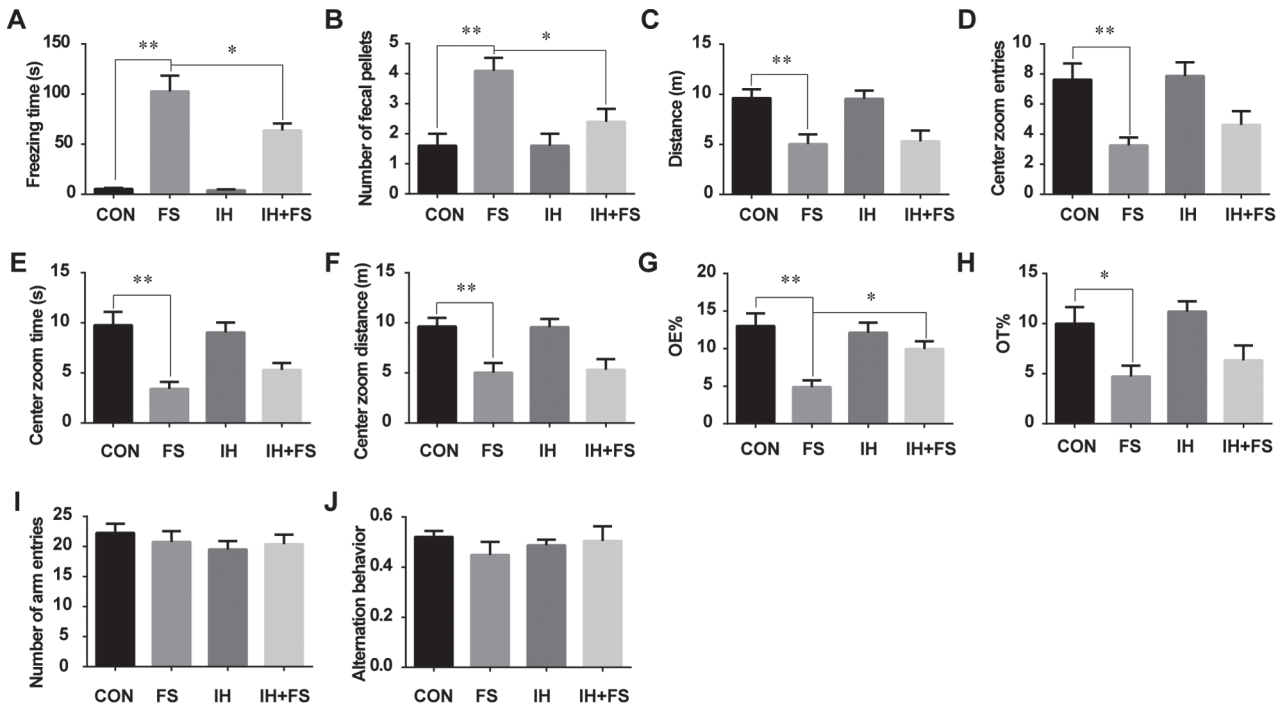


图 2. 间歇性低氧预处理对创伤后应激障碍模型小鼠行为学的影响

Fig. 2. Effect of intermittent hypoxic preconditioning (IH) on behavior of post-traumatic stress disorder (PTSD) model mice. *A–B*: Effect of IH on freezing time (*A*) and the number of fecal pellets (*B*) in the fear conditioning test of PTSD model mice. *C–F*: Effect of IH on distance (*C*), center zoom entries (*D*), center zoom time (*E*) and center zoom distance (*F*) in open field test (OFT) of PTSD model mice. *G–H*: Effect of IH on the percentage of open-arm entries (OE%) (*G*) and the percentage of open-arm time (OT%) (*H*) in elevated plus maze (EPM) of PTSD model mice. *I–J*: Effect of IH on the number of arm entries (*I*) and alternation behavior (*J*) in Y-maze of PTSD model mice. CON: control group; FS: PTSD model group; IH: IH preconditioning group; IH+FS: PTSD model group preconditioned with IH. Mean \pm SEM, $n = 8-10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4A、B)；模型(电击)对VEGF蛋白表达作用不明显($F = 0.0002$, $P = 0.96$)，IH预处理对VEGF蛋白表达有明显影响($F = 18.25$, $P < 0.01$)，这两个因素之间交互作用不显著($F = 2.61$, $P = 0.13$) (图4A、C)；电击和IH对BDNF蛋白表达均有作用($F_{模型} = 108.2$, $P < 0.01$ ； $F_{IH} = 249.6$, $P < 0.01$)，且这两个因素存在交互作用($F = 9.154$, $P < 0.05$) (图4A、D)。组间两两分析结果显示：模型组与对照组相比，HIF-1 α 和VEGF蛋白水平没有差异，但BDNF水平模型组高于对照组，且差异具有统计学意义($P < 0.01$)；IH组相对于对照组，HIF-1 α 、VEGF和BDNF蛋白水平均明显升高，且差异有统计学意义($P < 0.01$)；IH预处理的模型组相比于模型组，HIF-1 α 、VEGF和BDNF蛋白水平均升高，且HIF-1 α 和BDNF的差异具有统计学意义(图4A~D)。

杏仁核脑区的双因素方差分析结果显示：模型(电击)对HIF-1 α 、VEGF、BDNF蛋白表达作用不

显著(HIF-1 α : $F = 0.73$, $P = 0.12$; VEGF: $F = 0.07$, $P = 0.80$; BDNF: $F = 0.19$, $P = 0.67$)，IH对这三个蛋白表达均有明显影响(HIF-1 α : $F = 23.01$, $P < 0.01$; VEGF: $F = 21.67$, $P < 0.01$; BDNF: $F = 31.81$, $P < 0.01$)，但这两个因素之间交互作用不显著(HIF-1 α : $F = 0.22$, $P = 0.65$; VEGF: $F = 0.14$, $P = 0.71$; BDNF: $F = 0.39$, $P = 0.54$) (图4E~H)。组间两两分析结果显示：模型组与对照组相比，这三个蛋白表达水平差异不明显；与对照组相比，IH组HIF-1 α 、VEGF、BDNF蛋白明显增加，且差异有统计学意义($P < 0.05$)；IH预处理的模型组相比于模型组，这三个蛋白水平有所增加，且差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图4E~H)。mPFC脑区中这三个蛋白变化与杏仁核脑区基本一致(图4I~L)。

3 讨论

本研究中我们采用不可逃避足底电击联合场景

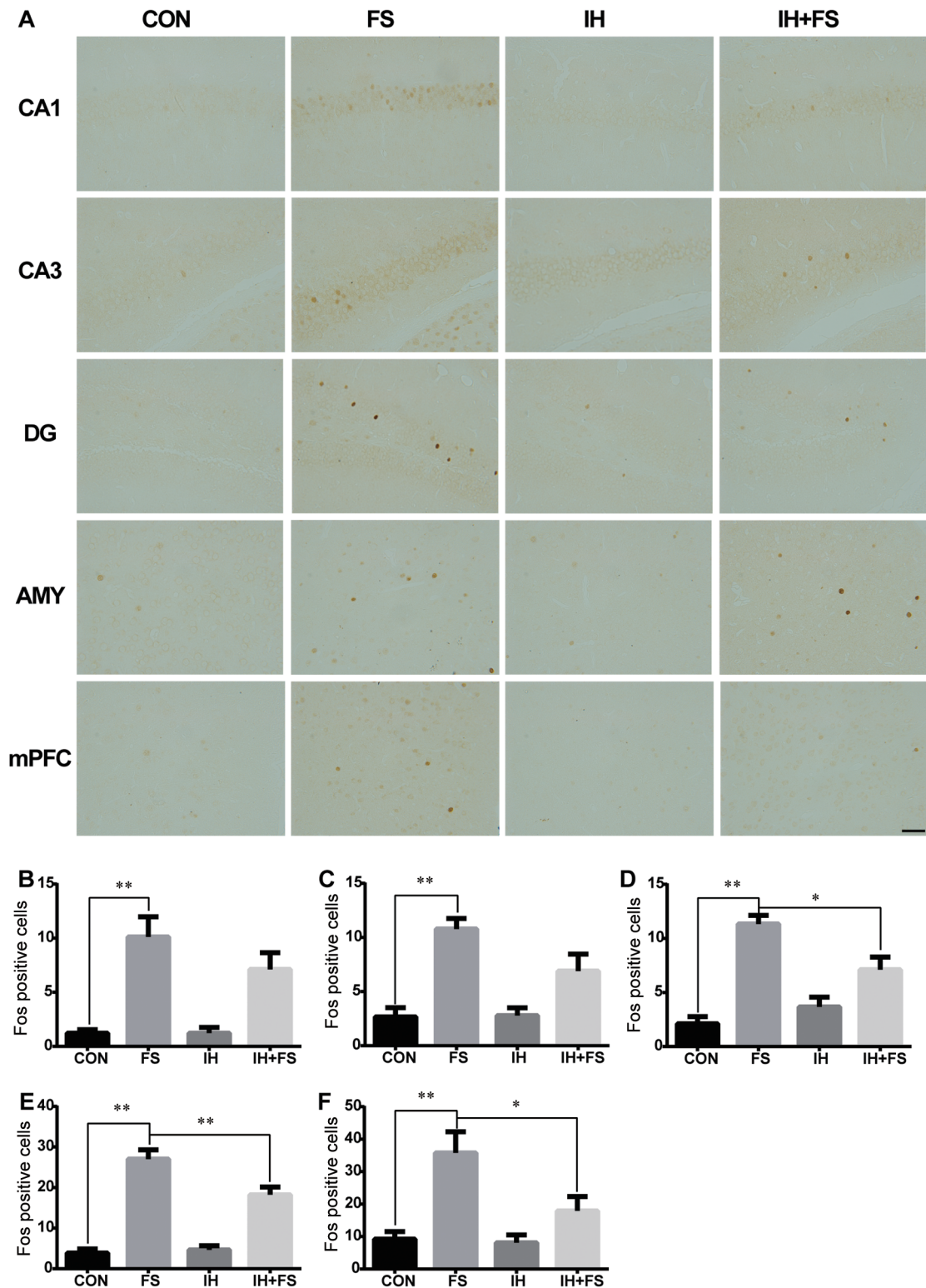


图 3. 间歇性低氧预处理对PTSD小鼠海马(CA1, CA3, DG区)、杏仁核、内侧前额叶皮层Fos阳性神经元的影响
 Fig. 3. Effects of intermittent hypoxic preconditioning on the number of Fos-positive neurons in hippocampus (CA1, CA3, DG), amygdala (AMY) and medial prefrontal cortex (mPFC) in PTSD mice. *A*: The representative image of Fos immunohistochemical staining in hippocampus (CA1, CA3, DG area), AMY and mPFC. Scale bar, 100 μ m. *B-F*: Statistics of Fos immunohistochemical staining in hippocampus (CA1, CA3, DG area), AMY and mPFC. CON: control group; FS: PTSD model group; IH: IH preconditioning group; IH+FS: PTSD model group preconditioned with IH. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

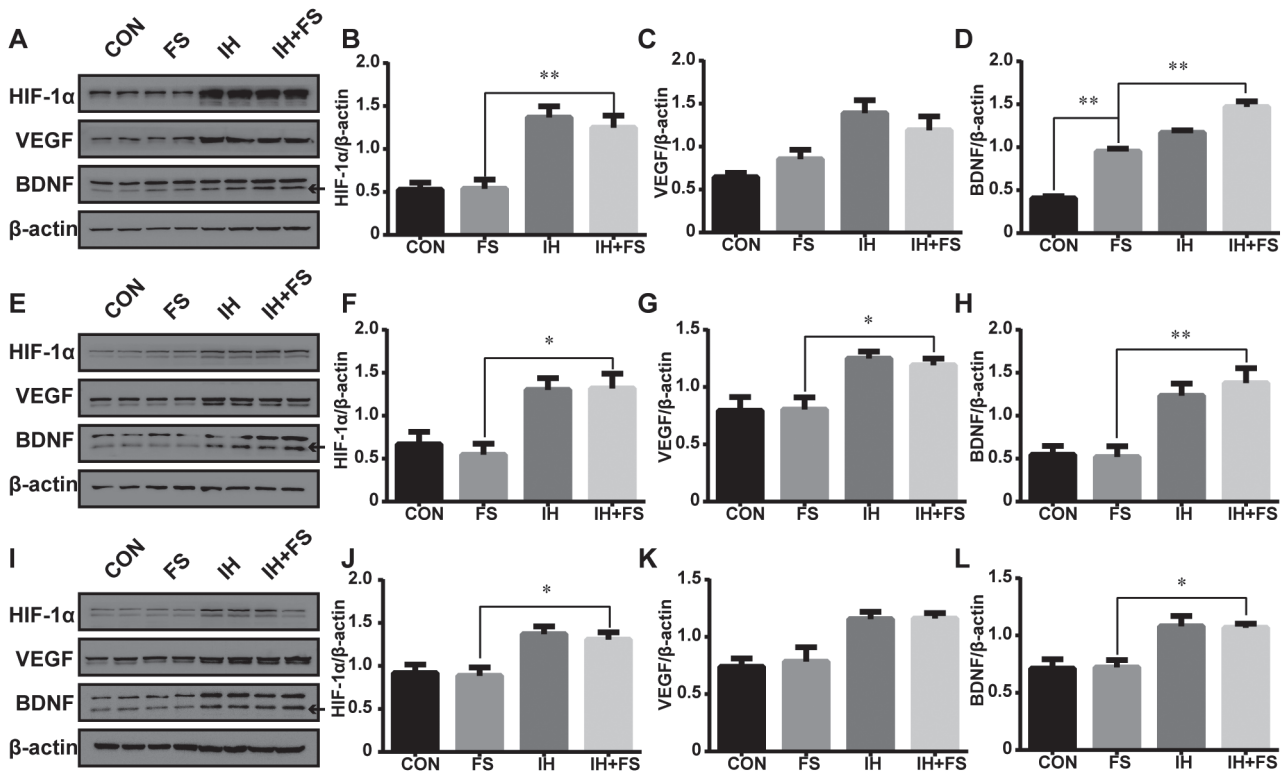


图 4. 间歇性低氧预处理对PTSD小鼠海马、杏仁核、前额叶皮层中HIF-1 α 、VEGF、BDNF蛋白表达的影响

Fig. 4. Effects of intermittent hypoxic preconditioning (IH) on expression of HIF-1 α , VEGF and BDNF in hippocampus, amygdala and mPFC of PTSD mice. A: The representative Western blot images of HIF-1 α , VEGF and BDNF protein expression in hippocampus of PTSD mice by IH. B-D: The gray scale analysis of the protein expression of HIF-1 α (B), VEGF (C) and BDNF (D) in hippocampus. E: The representative Western blot images of HIF-1 α , VEGF and BDNF protein expression in amygdala of PTSD mice by IH. F-H: The gray scale analysis of the protein expression of HIF-1 α (F), VEGF (G) and BDNF (H) in amygdala. I: The representative Western blot images of HIF-1 α , VEGF and BDNF protein expression in mPFC of PTSD mice by IH. J-L: The gray scale analysis of the protein expression of HIF-1 α (J), VEGF (K) and BDNF (L) in mPFC. CON: control group; FS: PTSD model group; IH: IH preconditioning group; IH+FS: PTSD model group preconditioned with IH. Mean \pm SEM, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

再现制备 PTSD 小鼠模型,通过旷场、高架十字迷宫、Y 迷宫和条件性恐惧测试检测其恐惧和焦虑水平。结果显示,模型(电击)对小鼠的焦虑和恐惧行为影响很大,且模型组与对照组相比,小鼠恐惧和焦虑行为明显增加,表明模型建立成功。在某些指标上(开放臂运动次数,僵住时间和排便数量),IH 与模型(电击)存在交互作用,且经过 IH 预处理的模型组小鼠,其恐惧和焦虑行为有所降低,这说明 IH 预处理能减轻 PTSD 小鼠的恐惧和焦虑情绪,提示 IH 有可能成为预防 PTSD 的有效手段。

对人和动物的研究表明,PTSD 的病理变化涉及的主要脑区包括海马、杏仁核和 mPFC^[13]。*c-fos* 是一种即早基因,常常作为脑功能示踪和神经元兴奋的标志,而 Fos 蛋白是其表达产物^[14]。我们通过 Fos 免疫组化染色来观察 PTSD 模型小鼠在恐惧记

忆表达时这三个脑区神经元的兴奋情况。结果显示模型(电击)对小鼠海马各亚区(CA1, CA3, DG)、杏仁核和 mPFC 中 Fos 阳性神经元数量影响很大,模型(电击)能明显提高这些脑区神经元的兴奋性;在杏仁核和海马 DG 区,模型(电击)和 IH 这两个因素存在交互作用,且经过 IH 预处理的模型组小鼠,这三个脑区中 Fos 阳性神经元的数量有所减少。这提示 IH 预处理有可能通过减少海马、杏仁核和 mPFC 中神经元的过度兴奋,从而减轻 PTSD 模型小鼠的恐惧和焦虑情绪。

我们同时检测了海马、杏仁核和 mPFC 这三个脑区 HIF-1 α 、VEGF 的变化。虽然模型组与对照组相比,这两个蛋白水平变化不明显,模型(电击)和 IH 这两个因素之间交互作用也不显著,但 IH 预处理的模型组相比于模型组,这两个蛋白表达明显

增加。有研究报道 PTSD 病人血清中 HIF-1 α 基因表达水平明显减少^[15], 且 IH 对机体的保护作用主要是通过激活 HIF 信号通路, 增加 HIF-1 及其下游靶基因的表达和蛋白的合成来实现的^[16, 17]。所以, 我们推测, IH 预处理可能通过促进 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达, 对 PTSD 起到保护作用。

IH 能促进 BDNF 的表达, 在适度低氧的神经损伤修复中具有一定保护作用^[18]。BDNF 是广泛表达于中枢神经系统的一种神经营养因子, 能影响恐惧记忆的形成、巩固和消退, 参与调节 PTSD 的发病过程^[19, 20]。海马、杏仁核和 mPFC 是与 PTSD 发病相关的重要脑区^[13]。研究报道, β -丙氨酸 (β -alanine, BA)、己酮可可碱 (pentoxifylline, PTX) 等药物^[21-23]可以增加海马中的 BDNF 表达; 奥氮平 (olanzapine, OLZ) 等药物^[24, 25]可以增加杏仁核中 BDNF 表达; Sigma 1 受体激动剂 PRE-084 等^[26, 27]能够增加 mPFC 中 BDNF 表达; 上述这些药物都可以通过调节脑内 BDNF 的表达从而减轻 PTSD 模型动物恐惧、焦虑样行为。在本研究中, 电击仪对海马组织 BDNF 蛋白表达存在作用, 而对杏仁核及 mPFC 中 BDNF 蛋白没有作用, 这证明了情景条件性恐惧的形成和提取更多依赖于海马^[28]。IH 对这三个脑区 BDNF 蛋白均有影响, 能使这三个脑区 BDNF 蛋白水平提高, 这之前研究结果一致^[9, 10]。在海马脑区, IH 与电击这两个因素存在交互作用, 且 IH 预处理的模型组小鼠海马中 BDNF 表达明显高于模型组, 这提示 IH 预处理对 PTSD 的预防作用可能与海马中 BDNF 表达增加有关。

综上所述, IH 预处理对 PTSD 模型小鼠恐惧和焦虑行为有改善作用, 其机制可能与减少海马、杏仁核及 mPFC 神经元的兴奋, 以及提高 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平有关, 还可能涉及 BDNF 相关的神经元可塑性, 但是具体调节机制尚有待进一步研究。

参考文献

- Shalev A, Liberzon I, Marmar C. Post-traumatic stress disorder. *N Engl J Med* 2017; 376(25): 2459–2469.
- Abdallah CG, Averill LA, Akiki TJ, Raza M, Averill CL, Goma H, Adikey A, Krystal JH. The neurobiology and pharmacotherapy of posttraumatic stress disorder. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019; 59: 171–189.
- Viscor G, Torrella JR, Corral L, Ricart A, Javierre C, Pages T, Ventura JL. Physiological and biological responses to short-term intermittent hypobaric hypoxia exposure: from sports and mountain medicine to new biomedical applications. *Front Physiol* 2018; 9: 814.
- Xi L, Serebrovskaya TV. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*. London: Springer, 2012.
- Richalet JP, Bittel J, Herry JP, Savourey G, Le Trong JL, Auvert JF, Janin C. Use of a hypobaric chamber for pre-acclimatization before climbing Mount Everest. *Int J Sports Med* 1992; 13 Suppl 1: S216–S220.
- Stray-Gundersen J, Levine BD. “Living high and training low” can improve sea level performance in endurance athletes. *Br J Sports Med* 1999; 33(3): 150–151.
- Fabian Z, Taylor CT, Nguyen LK. Understanding complexity in the HIF signaling pathway using systems biology and mathematical modeling. *J Mol Med (Berl)* 2016; 94(4): 377–390.
- Pugh CW. Modulation of the hypoxic response. *Adv Exp Med Biol* 2016; 903: 259–271.
- Kushwah N, Jain V, Deep S, Prasad D, Singh SB, Khan N. Neuroprotective role of intermittent hypobaric hypoxia in unpredictable chronic mild stress induced depression in rats. *PLoS One* 2016; 11(2): e0149309.
- Zhu XH, Yan HC, Zhang J, Qu HD, Qiu XS, Chen L, Li SJ, Cao X, Bean JC, Chen LH, Qin XH, Liu JH, Bai XC, Mei L, Gao TM. Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *J Neurosci* 2010; 30(38): 12653–12663.
- Zhu LL, Zhao T, Li HS, Zhao H, Wu LY, Ding AS, Fan WH, Fan M. Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain Res* 2005; 1055(1–2): 1–6.
- Wen H (文浩), Liu QD, Li SS, Zhou LJ, Fan SY. Improvement effect of extract of St. John’s wort tablets on fear and anxiety behavior of post-traumatic stress disorder model mice. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)* 2018; 32(1): 65–71 (in Chinese with English abstract).
- Careaga MBL, Girardi CEN, Suchecki D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 2016; 71: 48–57.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 1993; 14(3): 173–213.
- Rasmus A, Polrola P, Goral-Polrola J, Zychowska M, Mirski A, Knapik H. Differences in the expression of selected genes associated with cell stress response in a PTSD patient and in healthy individuals - a case study. *Ann Agric Environ Med* 2017; 24(2): 332–337.
- Wang Z, Si LY. Hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the cardioprotective effects of

- intermittent hypoxia in rats. *Ups J Med Sci* 2013; 118(2): 65–74.
- 17 Akat F, Ficicilar H, Durak A, Tuncay E, Dursun AD, Topal Celikkan F, Sabuncuoglu B, Turan B, Bastug M. Intermittent hypoxia induces beneficial cardiovascular remodeling in left ventricular function of type 1 diabetic rat. *Anatol J Cardiol* 2018; 19(4): 259–266.
- 18 Satriotomo I, Dale EA, Dahlberg JM, Mitchell GS. Repetitive acute intermittent hypoxia increases expression of proteins associated with plasticity in the phrenic motor nucleus. *Exp Neurol* 2012; 237(1): 103–115.
- 19 Mahan AL, Ressler KJ. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends Neurosci* 2012; 35(1): 24–35.
- 20 Green CR, Corsi-Travali S, Neumeister A. The role of BDNF-TrkB signaling in the pathogenesis of PTSD. *J Depress Anxiety* 2013; 2013(S4): pii: 006.
- 21 Hoffman JR, Ostfeld I, Stout JR, Harris RC, Kaplan Z, Cohen H. beta-Alanine supplemented diets enhance behavioral resilience to stress exposure in an animal model of PTSD. *Amino Acids* 2015; 47(6): 1247–1257.
- 22 Alzoubi KH, Khabour OF, Ahmed M. Pentoxifylline prevents post-traumatic stress disorder induced memory impairment. *Brain Res Bull* 2018; 139: 263–268.
- 23 Burstein O, Shoshan N, Doron R, Akirav I. Cannabinoids prevent depressive-like symptoms and alterations in BDNF expression in a rat model of PTSD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2018; 84(Pt A): 129–139.
- 24 Reddy NR, Krishnamurthy S. Repeated olanzapine treatment mitigates PTSD like symptoms in rats with changes in cell signaling factors. *Brain Res Bull* 2018; 140: 365–377.
- 25 Li G, Wang G, Shi J, Xie X, Fei N, Chen L, Liu N, Yang M, Pan J, Huang W, Xu Y. trans-Resveratrol ameliorates anxiety-like behaviors and fear memory deficits in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Neuropharmacology* 2018; 133: 181–188.
- 26 Zhang XR (张秀荣), Ji LL, Sun Y. Effects of Aripiprazole on anxiety-like behavior and BDNF expression in prefrontal cortex of rat PTSD model. *Prog Anatom Sci (解剖科学进展)* 2017; 23(6): 608–612 (in Chinese with English abstract).
- 27 Tong L (佟雷), Ji LL, Peng JP, Fu CH, Wang ZY. PRE-084 ameliorates anxiety-like behavior via BDNF- TrkB signaling pathway in rat PTSD model. *Prog Anatom Sci (解剖科学进展)* 2017; 23(1): 93–96,102 (in Chinese with English abstract).
- 28 Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 1992; 106(2): 274–285.