

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.06.005

李丹丹, 柴露露, 杨垚, 等. 褪黑素抗慢性束缚应激致小鼠脑损伤研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(6): 44-56.

褪黑素抗慢性束缚应激致小鼠脑损伤研究

李丹丹, 柴露露, 杨垚, 姚文倩, 林如涛

贵州大学 动物科学学院, 贵阳 550025

摘要: 心理应激是伴侣动物(如犬、猫)在现代驯养环境中面临的主要健康威胁之一。长期暴露于高压环境可引发其行为异常、免疫功能抑制及神经退行性病变, 严重影响动物福利与生存质量。通过对昆明鼠进行为期 28 d 的慢性束缚应激(Chronic restraint stress, CRS)建立心理应激模型, 并外源添加褪黑素(Melatonin, MT)干预, 利用行为学、ELISA、生物化学、组织学及免疫组织化学等技术, 评估 MT 对 CRS 所致小鼠脑损伤的潜在保护作用。结果表明: CRS 导致小鼠出现焦虑抑郁样行为, 并显著上调小鼠血浆及海马体中 CORT、NE、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量($p < 0.05$), 显著下调 5-HT、MT、DA 含量($p < 0.05$); 同时显著上调小鼠血浆中 MDA 水平, 下调 CAT、SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平($p < 0.05$)。进一步研究发现, CRS 显著降低小鼠大脑前额叶皮质和海马体神经元及 NeuN 蛋白阳性表达面积占比($p < 0.05$)。相反, 添加 MT 干预缓解了 CRS 致小鼠应激反应和焦虑抑郁样行为的发生, 抑制了机体氧化应激水平, 同时保护小鼠大脑神经元, 表现为显著下调小鼠血浆中 CORT、NE、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量($p < 0.05$), 上调 5-HT、MT、DA 及抗氧化酶 CAT、SOD、GSH-Px 水平($p < 0.05$), 从而抑制 MDA 的产生, 抑制 NeuN 蛋白阳性表达的降低, 缓解小鼠心理应激程度, 表明 MT 对 CRS 致小鼠脑损伤具有潜在的治疗作用。

关键词: 小鼠; 心理应激; 慢性束缚应激; 褪黑素; 前额叶皮质; 海马体

中图分类号: S852.3

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)06-0044-13

Study on the Role of Melatonin on Brain Injury Induced by Chronic Restraint Stress in Mice

LI Dandan, CHAI Lulu, YANG Yao, YAO Wenqian, LIN Rutao

College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Psychological stress is one of the major health threats faced by companion animals such as dogs

收稿日期: 2025-02-26

基金项目: 贵州省科学基金一般项目(黔科合基础-ZK[2023]一般 107); 贵州大学培育基金项目(贵大基础[2024]07 号)。

作者简介: 李丹丹, 硕士研究生, 主要从事动物解剖与组织胚胎学研究。

通信作者: 林如涛, 博士, 讲师。

and cats in modern domestic environments. Long-term exposure to high-stress conditions can lead to behavioral abnormalities, suppression of immune function, and neurodegenerative diseases, seriously affecting animal welfare and quality of life. This study established a psychological model in Kunming mice through 28 days of chronic restraint stress and then intervened with exogenous melatonin. Behavioral, ELISA, biochemical, histological and immunohistochemical techniques were used to evaluate the potential protective effect of melatonin (MT) on brain injury caused by chronic restraint stress (CRS) in mice. The results showed that CRS led to anxiety and depression-like behaviors in mice, significantly increased the levels of CORT, NE, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the plasma and hippocampus of mice ($p < 0.05$), significantly decreased the levels of 5-HT, MT and DA ($p < 0.05$), and significantly increased the level of MDA in the plasma of mice and decreased the levels of CAT, SOD, GSH-Px and T-AOC ($p < 0.05$). Further studies found that CRS significantly reduced the proportion of positive expression areas of prefrontal cortex and hippocampus neurons and NeuN protein in mice ($p < 0.05$). In contrast, after the intervention with MT, the stress response and anxiety and depression-like behaviors caused by CRS in mice were alleviated, the level of oxidative stress in the body was inhibited, and the neurons in the brain of mice was protected, which was manifested as a significantly decrease in the levels of CORT, NE, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the plasma of mice ($p < 0.05$), an increase in the levels of 5-HT, MT, DA and the antioxidant enzymes including CAT, SOD and GSH-Px ($p < 0.05$), thereby inhibiting the production of MDA and the reduction of the positive expression of NeuN protein, and alleviating the degree of psychological stress of mice. In conclusion, this study shows that MT has a potential therapeutic effect on the brain injury caused by CRS in mice.

Key words: mice; psychological stress; chronic restraint stress; melatonin; prefrontal cortex; hippocampus

心理应激是伴侣动物(如犬、猫)在现代驯养环境中面临的主要健康威胁之一^[1]。长期暴露于高压环境可引发伴侣动物行为异常、免疫功能抑制及神经退行性病变,严重影响动物福利与生存质量^[2-3]。伴侣动物的心理应激源主要包括社交孤立、环境单调性(如长期笼养)、缺乏探索机会或过度限制活动等^[4]。其中,慢性束缚应激(Chronic restraint stress, CRS)作为一种典型的可控性心理应激模型,因与家庭宠物被长期限制活动的实际情况高度相似,成为研究伴侣动物应激相关神经损伤的主要范式^[5-6]。一直以来,人们对伴侣动物心理应激的关注及研究并不充分,其领域还有大量空白需要填补。因此,预防及治疗动物心理应激具有十分重要的意义。

有研究表明,心理应激可激活下丘脑—垂体—肾上腺轴(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA),促使糖皮质激素异常升高,进而引发系统性病理改变^[7]。从行为学层面来看,长期应激导致犬类出现过度理毛(自残倾向)、无目的踱步、社交回避等刻板行为^[4];猫科动物则表现为过度警觉、排泄异常或攻击性增强^[8]。前人研究发现,CRS能够诱发动物焦虑抑郁样行为,并伴随机体促炎细胞因子和应激激素水平的升高及脑内抗氧化水平的降低^[9];另有研究发现,CRS可诱发大鼠大脑海马体萎缩、神经发生减少、血清皮质醇水平升高等现象^[10]。因此,开发针对心理应激所致脑损伤的特异性干预药物,对伴侣动物临床医学具有重要价值。

褪黑素(Melatonin, MT)是由脑松果体分泌的天然内源性激素,其独特的脂溶性特征使其可自由穿透血脑屏障,直接调控中枢神经系统功能^[11]。其可广泛调控多种生理过程,包括昼夜节律、免疫功能、神经内分泌调节、氧化应激抑制、炎症反应及突触可塑性等^[12-13]。研究表明,MT可通过抑制HPA轴的过度激活,降低机体皮质醇浓度,从而起到抗应激作用^[14]。同时,作为一种自由基清除剂,MT可直接清除ROS,

并通过激活 Nrf2 通路增强内源性抗氧化酶活性, 同时抑制 NF- κ B 信号传导, 降低脑组织 IL-1 β 、TNF- α 水平^[15-16]; 除此之外, MT 可通过 MT1/MT2 受体介导的 PI3K/Akt 信号通路, 上调海马体 BDNF 表达, 修复突触可塑性损伤^[17]。临床上常通过口服方式补充 MT 改善患者的睡眠障碍; 研究发现, 腹腔注射 MT 的生物利用度更高, 起效速度更快^[18]。

然而, 外源添加 MT 是否能缓解慢性应激所致机体心理应激程度, 保护脑区结构和功能的完整性仍未知。因此, 本研究通过对昆明鼠进行为期 28 d 的 CRS 建立心理应激模型, 并外源添加 MT 干预, 通过行为学测试、ELISA 试验、生化鉴定、Nissl 染色及免疫荧光染色等方法, 评估 MT 对 CRS 所致小鼠脑损伤的潜在保护作用, 为 MT 抗伴侣动物心理应激提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

CORT、NE、5-HT、MT、DA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 检测试剂盒购于武汉云克隆科技股份有限公司(货号: SEA133Mu、CEA907Ge、CEA808Ge、CEA908Ge、CEA851Ge、SEA563Mu、SEA079Mu、CEA540Ge); CAT、MDA、SOD 活性检测试剂盒, DAPI 溶液, 甲苯胺蓝染色液, 中性树胶购于北京索莱宝科技有限公司(货号: BC0205、BC0025、BC0175、C0065、G3662、G8590); GSH-Px、T-AOC 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所(货号: A005-1-2, A015-3-1); 樱花 OCT 冰冻包埋剂购于贵州赛研生物科技有限公司(货号: 4583); 增强型通用抗体稀释液购于广州亿涛生物科技有限公司(货号: ES-8792); Anti-NeuN Rabbit pAb 购于武汉赛维尔生物科技有限公司(货号: GB11138-50); iFluorTM 488 Conjugated Goat anti-rabbit IgG polyclonal Antibody 购于杭州华安生物技术有限公司(货号: HA1121); Ultra SensitiveTM SP(鼠/兔)IHC Kit 购于福州迈新生物技术开发有限公司(货号: KIT-9710); 褪黑素 98% 购于上海麦克林生化科技股份有限公司(货号: M813985); 全自动酶标仪购于广州市番禺区华鑫科技有限公司(型号: ELX808); 倒置荧光显微镜购于广州市明美光电技术有限公司(型号: MF52-N); 徕卡冷冻切片机购于徕卡显微系统(上海)贸易有限公司(型号: CM1950); 艾本德冷冻台式离心机购于成都锦世昌祥科技有限公司(型号: 5804R)。

1.2 方法

1.2.1 试验动物与处理

本研究严格遵循贵州大学动物试验伦理规范, 所有试验操作均经过贵州大学试验动物伦理委员会的批准(批准编号: EAE-GZY-2024-T222)。

试验动物: 雄性 6 周龄昆明鼠 48 只, 体质量(35 $\pm$ 2) g, 饲养于环境温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、环境湿度(50 $\pm$ 5)% 的试验动物饲养房中。适应 7 d 后, 随机分为对照+生理盐水组(Control with normal saline, CTL+NS)、对照+褪黑激素组(Control with melatonin, CTL+MT)、慢性束缚应激+生理盐水组(Chronic restraint stress with normal saline, CRS+NS)及慢性束缚应激+褪黑素组(Chronic restraint stress with melatonin, CRS+MT)共 4 组, 每组 2 笼小鼠。每天造模开始前 30 min, CTL+NS 和 CRS+NS 组腹腔注射生理盐水(每 0.1 mL 生理盐水中含有 20 μ L 无水乙醇), CTL+MT 及 CRS+MT 组腹腔注射 MT 溶液(醇溶, 溶解度为 50 mg/mL, 用生理盐水稀释至 10 mg/mL, 使用剂量为 20 mg/kg)。慢性束缚应激 5 h/d (9:00–14:00), 束缚期间各组小鼠禁食禁水, 试验持续 28 d。记录小鼠第 0 d、第 7 d、第 14 d、第 21 d 和第 28 d 的体质量变化。造模结束后对小鼠进行眼球采血后脱颈处死。血液样本肝素钠抗凝后于 4 $^{\circ}$ C 保存, 脑组织样本处理后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 行为学测试

试验第 29~31 d, 每组随机选取 6 只小鼠进行强迫游泳测试(Forced swimming test, FST)、悬尾测试(Tail suspension test, TST)、糖水偏好测试(Sucrose preference test, SPT)及旷场测试(Open field test, OFT), 参照葛俊铭等的试验方法^[19], 通过 SMART 3.0 软件进行分析。

1.2.3 ELISA 检测

血浆及组织中 CORT、NE、5-HT、MT、DA、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 检测参照武汉云克隆 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作及计算, 在酶标仪 450 nm 波长处测量各孔吸光度值。

1.2.4 氧化应激指标检测

参照索莱宝、南京建成氧化应激指标活性检测试剂盒说明书, 测定小鼠血浆中 CAT、MDA、SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平。

1.2.5 小鼠大脑 Nissl 染色

小鼠大脑浸入 OCT 包埋剂中, 于 -80 °C 保存。根据小鼠脑区图谱定位前额叶皮质(Prefrontal cortex, PFC)及海马体 CA1 区、CA3 区及 DG 区位置, 作冠状切面。冰冻切片于甲醛中固定 10 min, 蒸馏水浸洗 5 min。甲苯胺蓝染色液于 60 °C 烘箱中预热 30 min, 加盖浸染 20 min, 蒸馏水浸洗 5 min。95%乙醇分化 3~5 s。无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固并拍照记录。使用 Fiji Is Just ImageJ v1.50 计算视野内神经元面积。

1.2.6 小鼠大脑 NeuN 免疫荧光染色

染色前步骤同 1.2.5, 抗体按照体积比稀释: 一抗兔源 NeuN: 抗体稀释液(1:1 000), 荧光二抗山羊抗兔 IgG: 抗体稀释液(1:1 000)。参照试剂盒说明书进行操作, 滴加 DAPI 溶液, 3 min 后在荧光显微镜下拍照记录。使用 Fiji Is Just ImageJ v1.50 软件计算视野内 NeuN 蛋白阳性表达面积。

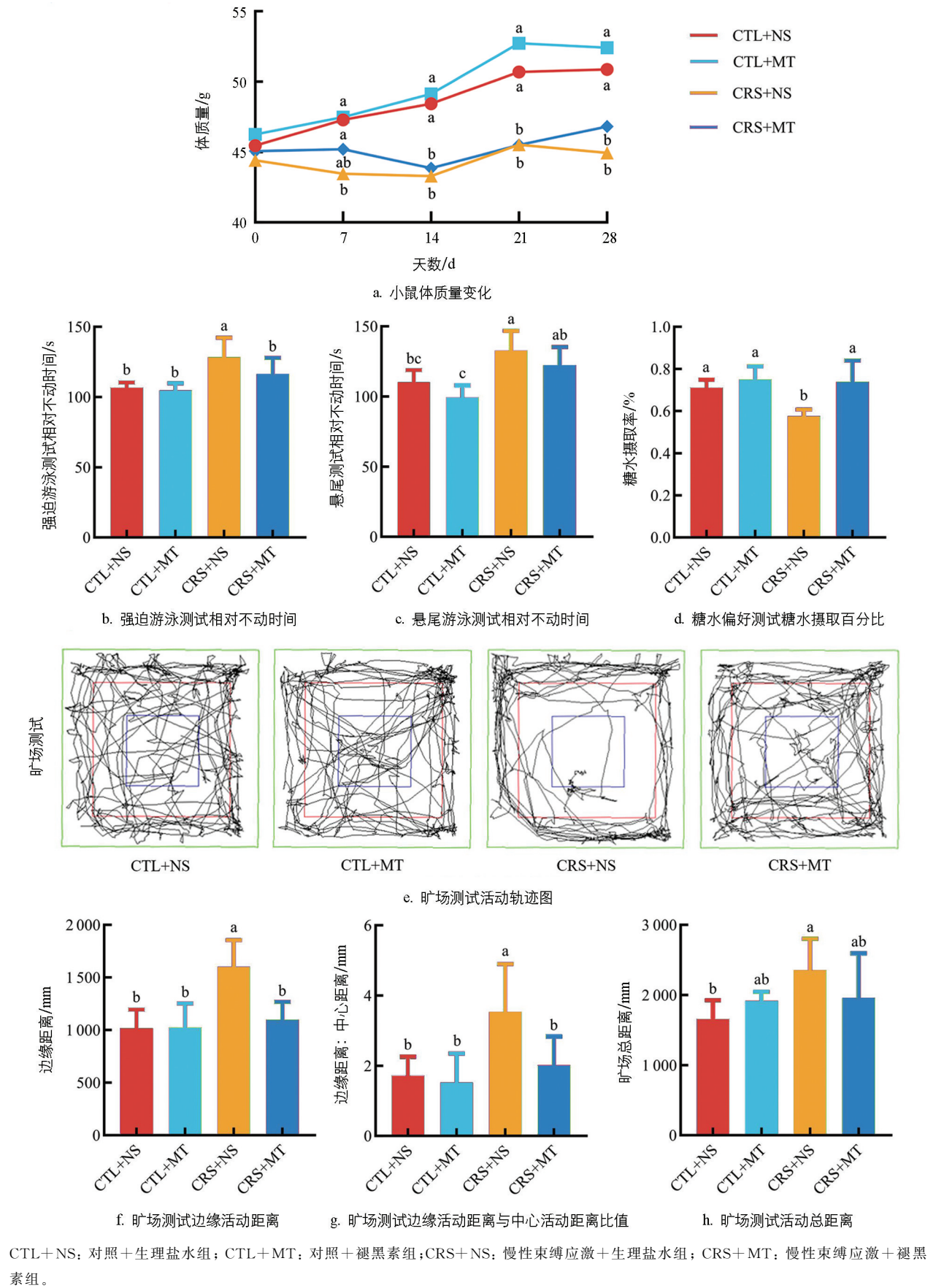
1.2.7 数据统计与分析

使用 IBM SPSS 26.0 软件对试验数据进行显著性差异分析, 通过单因素 ANOVA 检验组间差异, 并进行 LSD 及邓肯事后检验。组间差异通过字母标记法进行标记, 小写字母不同表示组间具有统计学意义($p < 0.05$), 小写字母相同表示组间不具有统计学意义($p > 0.05$)。使用 Graphpad Prism 10.1.2 绘图。

2 结果与分析

2.1 心理应激小鼠模型及 MT 干预小鼠模型建立验证分析

与 CTL+NS 组相比, CRS+NS 组在试验期间第 7 d 至第 28 d 的体质量显著下降 2.29%~11.68%($p < 0.05$), 添加 MT 干预后, 与 CRS+NS 组差异不显著($p > 0.05$, 图 1a)。行为学结果显示, 相较于 CTL+NS 组, CRS+NS 组的 FST 及 TST 相对不动时间分别显著上升 20.26%、20.35%($p < 0.05$), SPT 糖水摄取百分比显著下降 18.97%($p < 0.05$); 添加 MT 干预后, CRS+MT 组的 FST 及 TST 相对不动时间分别显著下降 9.44%、7.45%($p < 0.05$), SPT 糖水摄取百分比显著上升 28.31%($p < 0.05$, 图 1b-d)。OFT 结果显示, CRS+NS 组的活动轨迹集中于边缘区域(图 1e)。相较于 CTL+NS 组和 CRS+NS 组的边缘活动距离、边缘活动距离与中心活动距离比值及活动总距离显著上升 57.13%、106.25%、41.72%($p < 0.05$); 添加 MT 干预后, CRS+MT 组的边缘活动距离、边缘活动距离与中心活动距离比值及活动总距离显著下降 31.36%、43.12%、16.82%($p < 0.05$, 图 1f-h)。以上结果提示, CRS 导致小鼠出现焦虑抑郁样行为, 并伴随体质量增长缓慢现象。添加 MT 干预缓解了小鼠的焦虑抑郁样行为。



CTL+NS: 对照+生理盐水组; CTL+MT: 对照+褪黑素组; CRS+NS: 慢性束缚应激+生理盐水组; CRS+MT: 慢性束缚应激+褪黑素组。

图 1 小鼠体质量变化及行为学测试结果

小鼠血浆激素及促炎细胞因子含量变化情况见图 2。ELISA 结果表明,与 CTL+NS 组相比,CRS+NS 组血浆的皮质醇(Cortisol, CORT)和去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)比例显著上升 51.00%、59.21% ($p<0.05$);添加 MT 干预后,CRS+MT 组血浆的 CORT 及 NE 含量显著下降 17.77%、20.94% ($p<0.05$),提示 CRS 导致机体处于应激状态,添加 MT 干预后,机体的应激水平下调。相较于 CTL+NS 组,CRS+NS 组血浆的血清素(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、MT 及多巴胺(Dopamine, DA)含量显著下降 33.72%、16.72%、26.75% ($p<0.05$);添加 MT 干预后,CRS+MT 组血浆的 5-HT、MT 及 DA 含量显著上升 33.25%、43.10%、16.71% ($p<0.05$)。

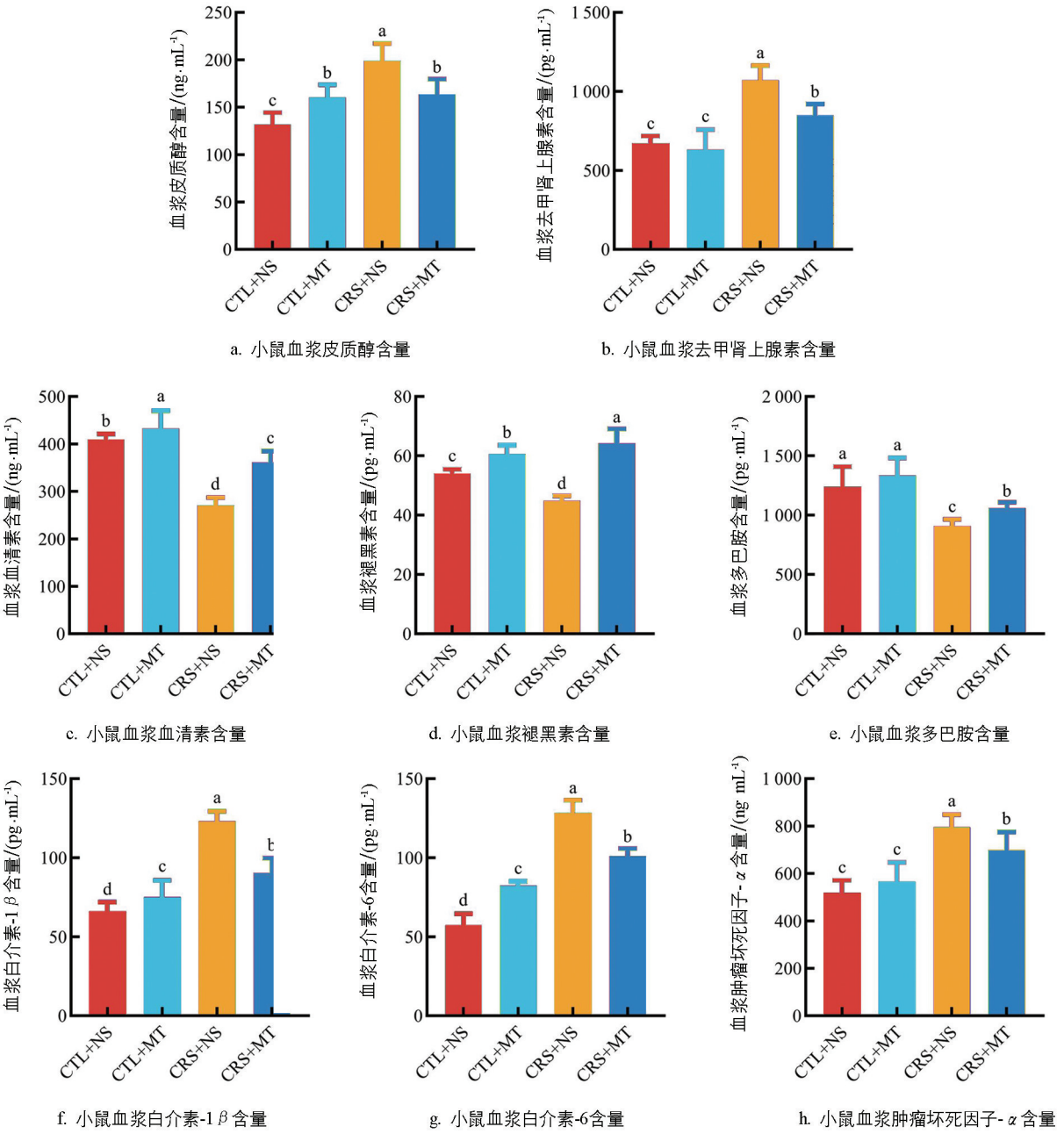


图 2 小鼠血浆激素及促炎细胞因子含量变化情况

5-HT 及 DA 含量与心理应激严重程度呈负相关,提示 CRS 导致机体单胺类神经递质水平异常,小鼠伴有心理应激。添加 MT 干预后,单胺类神经递质水平升高,小鼠的心理应激程度得到缓解。与 CTL+NS 组相比,CRS+NS 组血浆的白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死

因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量显著上升 86.53%、124.36%、53.85%($p<0.05$);添加 MT 干预后, CRS+MT 组血浆的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著下降 26.64%、21.57%、12.31%($p<0.05$)。提示 CRS 导致机体产生炎症反应,添加 MT 干预后,机体炎症反应减轻。综上所述,行为学测试结果及 ELISA 结果共同证明,心理应激小鼠模型及 MT 干预模型均建立成功。

2.2 MT 干预对 CRS 小鼠血浆氧化应激指标的影响

氧化应激指标测定结果表明,相较于 CTL+NS 组, CRS+NS 组血浆的丙二醛(MDA)水平显著上升 9.94%($p<0.05$),过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及总抗氧化能力水平(T-AOC)显著下降 46.64%、30.89%、53.03%、28.57%($p<0.05$);添加 MT 干预后, CRS+MT 组血浆的 MDA 水平显著下降 26.81%($p<0.05$), CAT、SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平显著上升 67.57%、46.77%、73.83%、60.53%($p<0.05$,图 3a-e)。提示 CRS 导致小鼠机体抗氧化能力下降,使其处于氧化应激状态。添加 MT 干预后,小鼠机体的抗氧化能力上升。

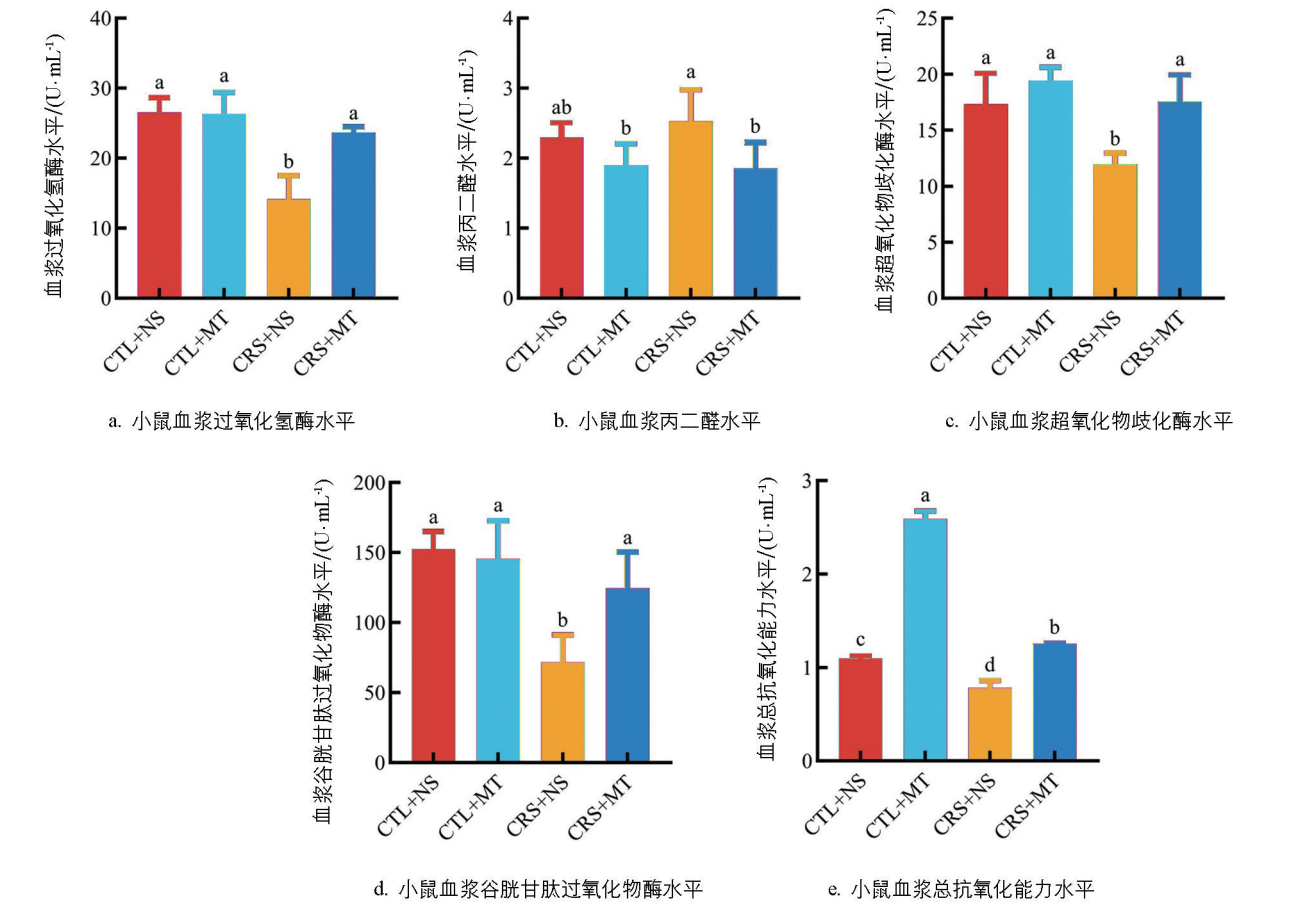


图 3 小鼠血浆抗氧化水平变化情况

2.3 MT 干预对 CRS 小鼠海马体激素及促炎细胞因子含量的影响

ELISA 结果表明,与 CTL+NS 组相比, CRS+NS 组海马体的 CORT 和 NE 含量显著上升 67.58%、53.55%($p<0.05$);添加 MT 干预后, CRS+MT 组海马体的 CORT 及 NE 含量显著下降 23.72%、15.23%($p<0.05$,图 4a、4b)。提示 CRS 导致海马体的应激激素含量上升,添加 MT 干预后,海马体的应激激素含量下降。相较于 CTL+NS 组, CRS+NS 组海马体的 5-HT 及 DA 含量分别显著下降 33.64%、39.25%($p<0.05$), MT 含量下降不显著($p>0.05$);添加 MT 干预后, CRS+MT 组海马体的 5-HT、MT 及 DA 含量显著上升 58.81%、9.96%、54.82%($p<0.05$,图 4c-e)。提示 CRS 导致海马体的单胺类神经递质含量下降,小鼠伴有心理应激。添加 MT 干预后,小鼠海马体的单胺类神经递质

水平上升,心理应激程度得到缓解。与 CTL+NS 组相比,CRS+NS 组海马体的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著上升 133.83%、100.44%、95.39%($p<0.05$);添加 MT 干预后,与 CRS+NS 组相比,CRS+MT 组海马体的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著下降 21.42%、16.15%、28.05%($p<0.05$,图 4f-h)。提示 CRS 导致海马体产生神经炎症,促炎细胞因子含量上升,添加 MT 干预后,海马体的神经炎症减轻,促炎细胞因子含量下降。

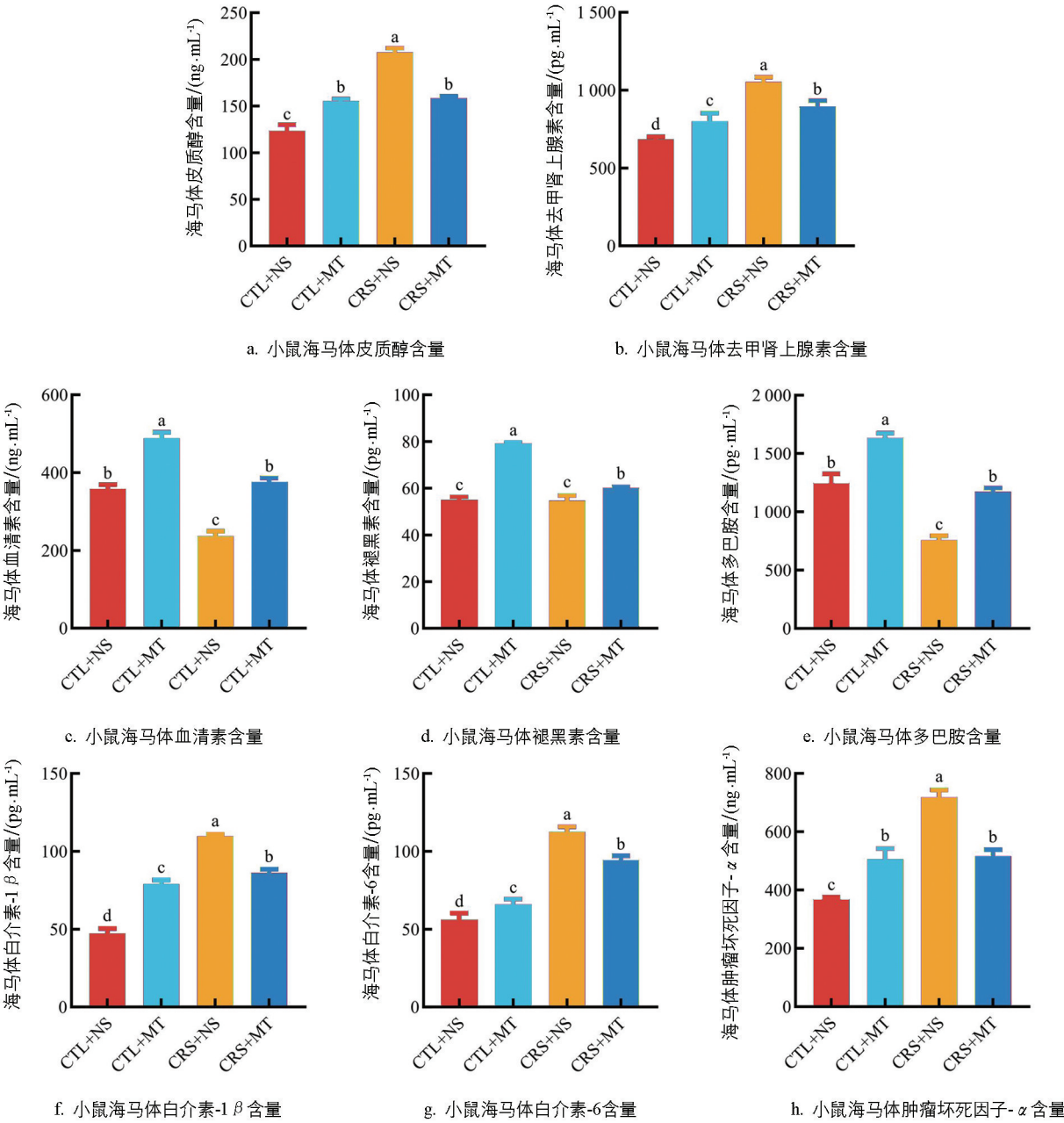
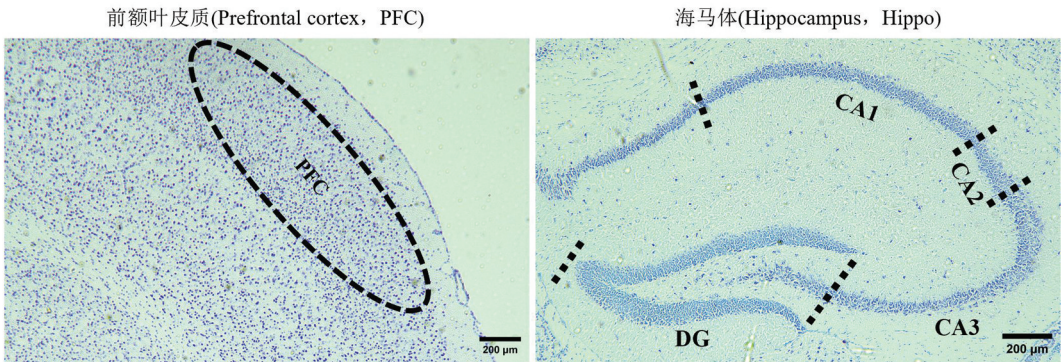


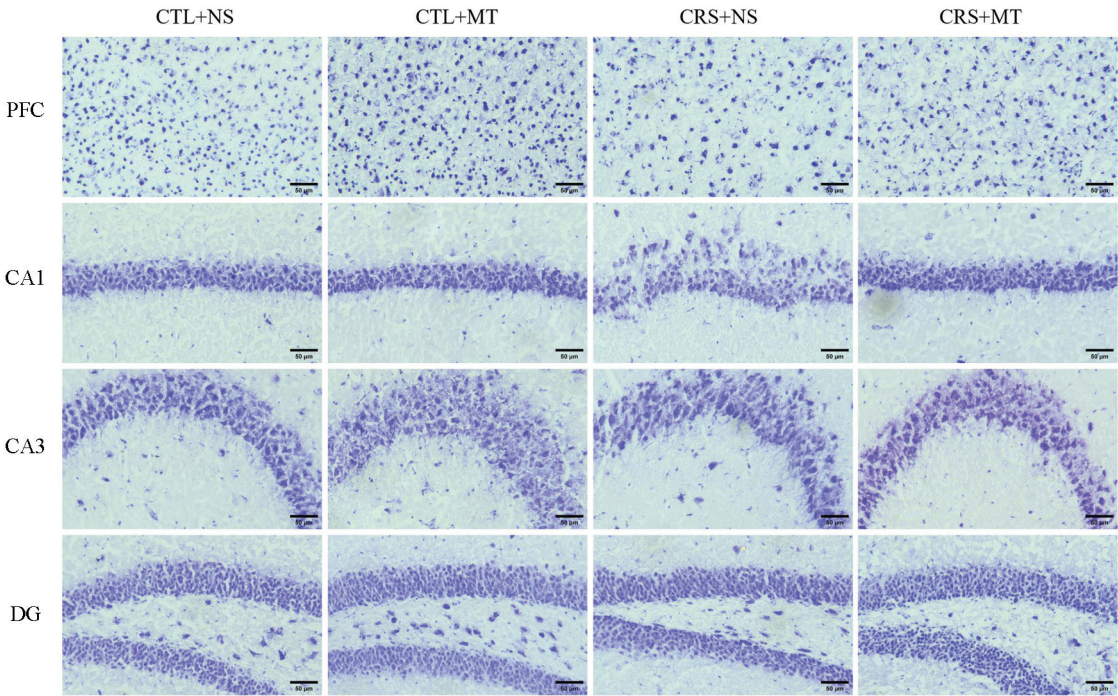
图 4 小鼠海马体激素及促炎细胞因子含量变化情况

2.4 MT 干预对 CRS 小鼠大脑神经元面积的影响

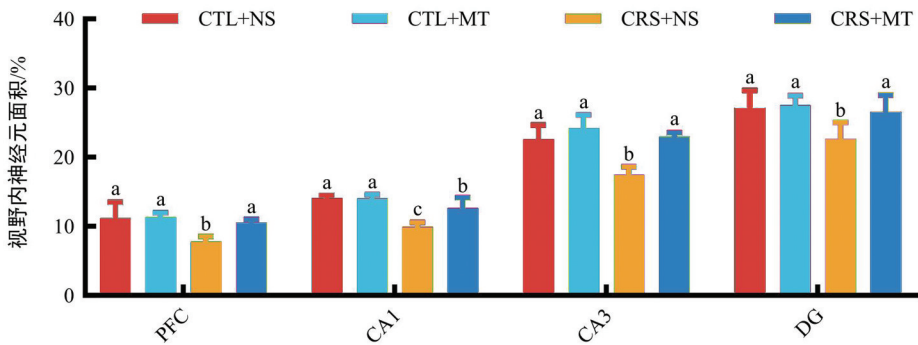
Nissl 染色结果表明(图 5a),相较于 CTL+NS 组,CRS+NS 组 PFC 区、CA1 区、CA3 区、DG 区的视野内神经元面积占比显著下降 29.80%、29.53%、22.65%、16.52%($p<0.05$);添加 MT 干预后,CRS+MT 组 PFC 区、CA1 区、CA3 区、DG 区的视野内神经元面积占比显著上升 34.56%、27.28%、31.69%、17.32%($p<0.05$,图 5b, 5c)。提示 CRS 导致小鼠大脑 PFC 及海马体神经元受到损伤,神经元数量、密度、大小显著下降,细胞排布紊乱,伴有形态异常。相反,添加 MT 干预后,各区域神经元损伤程度减轻。



a. 小鼠大脑前额叶皮质及海马体分区示意图(40x)



b. 小鼠大脑Nissl染色图片 (200x)



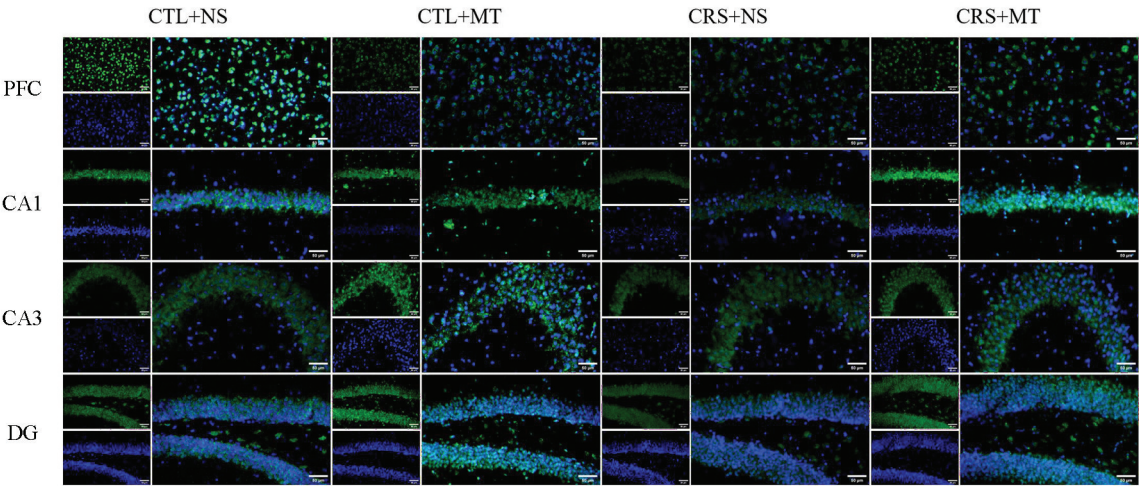
c. 小鼠大脑Nissl染色神经元面积统计结果

图 5 小鼠大脑 Nissl 染色结果

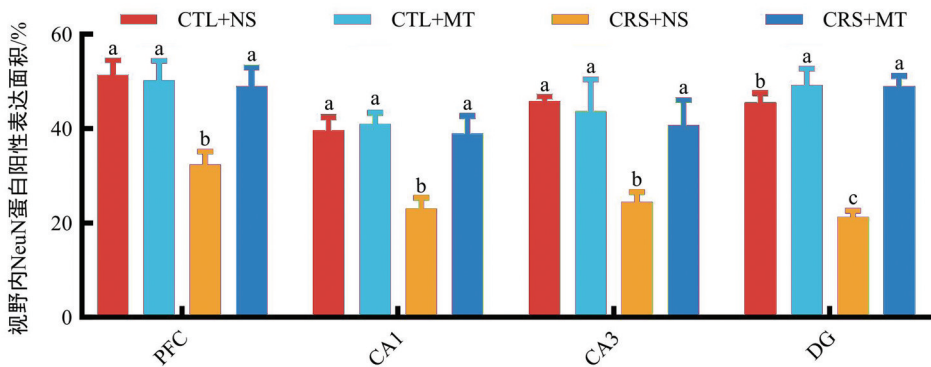
2.5 MT 干预对 CRS 小鼠大脑 NeuN 蛋白阳性表达面积的影响

NeuN 染色结果表明，相较于 CTL+NS 组，CRS+NS 组 PFC 区、CA1 区、CA3 区、DG 区的视野内 NeuN 蛋白阳性表达面积占比显著下降 37.00%、41.83%、46.50%、53.32% ($p<0.05$)；添加 MT 干预后，CRS+MT 组 PFC 区、CA1 区、CA3 区、DG 区的 NeuN 蛋白阳性表达面积占比显著上升 51.22%、

69.05%、66.37%、130.57% ($p<0.05$, 图 6a、6b)。提示 CRS 导致小鼠大脑 PFC 及海马体区域 NeuN 蛋白阳性表达面积降低, 神经发生减少。相反, 添加 MT 干预后, 各区域内 NeuN 蛋白阳性表达面积升高。



a. 小鼠大脑NeuN免疫荧光染色图片 (200 x)



b. 小鼠大脑NeuN蛋白阳性表达面积统计结果

图 6 小鼠大脑 NeuN 免疫荧光染色结果

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究对小鼠进行了为期 28 d 的 CRS, 并外源添加 MT 干预。结果表明, 与 CTL+NS 组相比, CRS+NS 组在试验期间第 7 d 至第 28 d 的体质量显著下降, 添加 MT 干预后, CRS+MT 组的体质量变化并不显著。在造模第 29~31 d, 对小鼠进行了 4 项行为学测试。结果表明, CRS+NS 组小鼠的 FST 及 TST 相对不动时间、OFT 边缘活动距离、边缘活动距离与中心活动距离比值及活动总距离显著上升, SPT 糖水摄取百分比显著下降, 提示 CRS 导致了小鼠焦虑抑郁样行为的发生。Deng 等^[20]研究发现, CRS 导致小鼠 FST 相对不动时间显著上升, SPT 糖水偏好百分比显著下降等, 这与本研究结果一致, 提示造模成功。然而, 前人研究发现, CRS 大鼠的 OFT 活动总距离显著下降, 这与我们的试验结果不符, 可能与 CRS 的持续时间、试验动物的品种有关^[21]。

CRS 通过激活 HPA 轴, 导致 CORT 的大量释放, 其神经毒性使 PFC 和海马体的神经元整体萎缩, 突触抑制, 神经发生等减少。此外, CRS 还会导致机体的体质量增长减缓, 免疫功能障碍, 氧化应激水平升高^[7]。因此, 本研究进一步测定了小鼠血浆及海马体中应激激素、神经递质的含量及抗氧化水平。结果表明, CRS+NS 组小鼠的血浆和海马体中, CORT、NE 含量显著上升, 5-HT、DA 和血浆中 MT 的含量显

著降低, 而 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量显著上升, 提示 CRS 导致小鼠机体处于应激状态, 中枢神经递质紊乱, 免疫功能障碍。CRS+NS 组小鼠血浆的 MDA 水平显著上升, CAT、SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平显著下降, 提示 CRS 导致小鼠机体抗氧化能力下降, 使其处于氧化应激状态。Ye 等^[22]发现, 由 CRS 诱导的小鼠血浆和海马体中 5-HT 含量显著下降, IL-1 β 、TNF- α 含量显著上升, 这与我们的研究结果一致。CRS 损伤了患畜大脑的情绪调节功能, 诱导了心理应激的发生。因此, 进一步通过组织学方法检测了小鼠大脑结构和功能的完整性。染色结果表明, CRS+NS 组小鼠大脑 PFC 及海马体神经元面积占比显著下降, NeuN 蛋白阳性表达面积占比显著下降; 神经元大部分呈现体积缩小, 细胞数量减少和细胞排布紊乱。大量研究表明, 长期应激会导致 PFC 和海马体的神经元整体萎缩以及突触抑制, 免疫炎症反应增强, 小胶质细胞被过度激活, 产生大量促炎细胞因子, 阻碍神经发生^[23]。

本研究发现 CRS 不仅导致单胺类神经递质分泌异常, 还导致了血浆内 MT 水平的下降。由于 MT 与 5-HT 及 DA 的特殊关系, 认为 MT 含量过低或许与焦虑抑郁样行为的发生有关。因此, 本研究通过腹腔注射 MT, 对 CRS 小鼠血浆中 MT 含量进行回补, 对其焦虑抑郁样行为、机体应激激素水平、单胺类神经递质水平以及促炎细胞因子水平等进行了测定。结果表明, MT 能够显著缓解 CRS 小鼠的焦虑抑郁样行为。添加 MT 干预后, CRS+MT 组小鼠的 FST 及 TST 相对不动时间、OFT 边缘活动距离、边缘活动距离与中心活动距离比值及活动总距离显著下降, SPT 糖水摄取百分比显著上升, 焦虑抑郁样行为得到缓解, 这与前人的研究结果一致^[24]。进一步研究表明, 添加 MT 逆转了由 CRS 诱导的血浆和海马体中 CORT、NE、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量升高, 并使得 5-HT、MT 和 DA 含量恢复到正常水平, 与 CTL+NS 组无显著差异。前人研究结果表明, 在 LPS 诱导小鼠抑郁样行为试验中, MT 治疗显著抑制促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平, 抑制 NF- κ B 磷酸化及神经胶质细胞的活化, 从而预防神经炎症^[25], 这与我们的研究结果类似。氧化应激指标结果表明, 添加 MT 干预显著降低了 CRS 小鼠机体的氧化应激水平。组织学试验结果表明, 添加 MT 干预逆转了由 CRS 诱导的小鼠大脑神经元损伤及 NeuN 蛋白表达降低, 提示 MT 对 CRS 造成的神经元损伤具有一定的保护作用。有研究结果证实, MT 能够通过降低海马体中的脂质过氧化和 NO 水平, 增强 SOD 和 CAT 活性, 减弱铜引起大鼠海马体氧化应激, 从而改善铜诱导的焦虑及抑郁样行为^[26]。本研究中, MT 或通过抑制氧化应激和炎症反应, 保护脑部结构和功能完整性, 抑制 CRS 致小鼠心理应激及焦虑抑郁样行为的发生。

MT 具有抗应激、抗氧化及抗炎作用, 且对于单胺类神经递质具有调节作用。应激状态下, MT 可对 HPA 轴产生显著的抑制性作用, 降低 CORT 及 NE 的释放^[14]。作为一种自由基清除剂, MT 抗氧化作用介导了神经保护作用。MT 能够刺激神经可塑性的所有阶段, 其发挥作用主要通过 M1、M2 受体及非受体途径进行。本研究结果证实, MT 通过下调应激激素, 提升机体抗氧化能力; 下调促炎细胞因子水平, 发挥了神经保护作用。然而, 其作用机制仍需进一步探讨。前人研究发现, MT 通过激活 Nrf2 通路、BDNF/TrkB 通路等发挥抗氧化作用, 激活抗氧化物酶, 降低机体氧化应激水平^[27-28]; MT 通过调节 COX-2 表达, 抑制 NF- κ B 信号通路等发挥抗炎作用, 下调 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子水平^[29-30]; 此外, MT 还通过激活脑内 M1、M2 受体, 调节中枢神经递质^[12]。MT 在抗 CRS 所致心理应激中的作用机制非常复杂, 因此, 对于本研究中 MT 发挥作用的分子机制及胞内信号途径, 还需进一步探索。

综上所述, 本研究发现 CRS 导致小鼠表现出焦虑抑郁样行为, 机体发生应激反应, 伴有氧化应激水平升高、单胺类神经递质紊乱、促炎细胞因子水平升高及大脑神经元损伤等。MT 通过其抗应激、抗氧化、抗炎及调节单胺类神经递质作用, 缓解了小鼠的心理应激, 发挥神经保护作用。研究表明, MT 对 CRS 致小鼠脑损伤具有潜在的治疗作用, 且无明显副作用, 为 MT 抗伴侣动物心理应激提供了理论依据。

3.2 结论

研究表明, CRS 诱导小鼠出现焦虑抑郁样行为, 致小鼠发生心理应激, 机体处于氧化应激状态, 免疫

功能下降,神经递质紊乱,神经功能异常。添加 MT 干预后,小鼠机体的应激水平下降,炎症反应减轻,神经功能异常得到缓解,脑损伤减轻。

参考文献:

- [1] BRAEM DUBE M, ZULCH H. Stress and Pheromonotherapy in Small Animal Clinical Behaviour [M]. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012.
- [2] STELLA J, CRONEY C, BUFFINGTON T. Effects of Stressors on the Behavior and Physiology of Domestic Cats [J]. Applied Animal Behaviour Science, 2013, 143(2-4): 157-163.
- [3] BUFFINGTON C T. Idiopathic Cystitis in Domestic Cats-Beyond the Lower Urinary Tract [J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2011, 25(4): 784-796.
- [4] BEERDA B, SCHILDER M B H, VAN HOOFF J A R A M, et al. Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. I. Behavioral Responses [J]. Physiology & Behavior, 1999, 66(2): 233-242.
- [5] WOO H, HONG C J, JUNG S, et al. Chronic Restraint Stress Induces Hippocampal Memory Deficits by Impairing Insulin Signaling [J]. Molecular Brain, 2018, 11(1): 1-13.
- [6] DRESCHER N A. The Effects of Fear and Anxiety on Health and Lifespan in Pet Dogs [J]. Applied Animal Behaviour Science, 2010, 125(3-4): 157-162.
- [7] ZÄNKERT S, BELLINGRATH S, WÜST S, et al. HPA Axis Responses to Psychological Challenge Linking Stress and Disease: What Do We Know on Sources of Intra- and Interindividual Variability? [J]. Psychoneuroendocrinology, 2019, 105: 86-97.
- [8] CARLSTEAD K, BROWN J L, STRAWN W. Behavioral and Physiological Correlates of Stress in Laboratory Cats [J]. Applied Animal Behaviour Science, 1993, 38(2): 143-158.
- [9] 陈亚婷, 雷梦珠, 张波, 等. 慢性应激诱导动物抑郁样行为机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 811-819.
- [10] VYAS A, MITRA R, SHANKARANARAYANA RAO B S, et al. Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons [J]. Journal of Neuroscience, 2002, 22(15): 6810-6818.
- [11] AHMAD S B, ALI A, BILAL M, et al. Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2023, 43(6): 2437-2458.
- [12] KHOLGHI G, ESKANDARI M, SHOKOUHI QARE SAADLOU M S, et al. Night Shift Hormone: How Does Melatonin Affect Depression? [J]. Physiology & Behavior, 2022, 252: 113835.
- [13] TONON A C, PILZ L K, MARKUS R P, et al. Melatonin and Depression: A Translational Perspective from Animal Models to Clinical Studies [J]. Frontiers in Psychiatry, 2021, 12: 638981.
- [14] LIN H W, LEE E J. Effects of Melatonin in Experimental Stroke Models in Acute, Sub-Acute, and Chronic Stages [J]. Neuropsychiatric Disease and Treatment, 2009, 5: 157-162.
- [15] REITER R J, ROSALES-CORRAL S, TAN D X, et al. Melatonin as a Mitochondria-Targeted Antioxidant: One of Evolution's Best Ideas [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(21): 3863-3881.
- [16] CHEN Y N, ZHAO Q, CHEN Q F, et al. Melatonin Attenuated Inflammatory Reaction by Inhibiting the Activation of P38 and NF- κ B in Taurocholate-Induced Acute Pancreatitis [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(4): 5934-5939.
- [17] ZHU C Z, LI G Z, LYU H F, et al. Modulation of Autophagy by Melatonin and Its Receptors: Implications in Brain Disorders [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2025, 46(3): 525-538.
- [18] REGODÓN S, RAMOS A, MÍGUEZ M P, et al. Vaccination Prepartum Enhances the Beneficial Effects of Melatonin on the Immune Response and Reduces Platelet Responsiveness in Sheep [J]. BMC Veterinary Research, 2012, 8: 1-18.
- [19] GE M J, CHEN G, ZHANG Z Q, et al. Chronic Restraint Stress Induces Depression-Like Behaviors and Alterations in

- the Afferent Projections of Medial Prefrontal Cortex from Multiple Brain Regions in Mice [J]. *Brain Research Bulletin*, 2024, 213: 110981.
- [20] DENG Y Y, ZHOU M F, WANG J F, et al. Involvement of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Chronic Restraint Stress: Disturbances of the Kynurenine Metabolic Pathway in both the Gut and Brain [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-16.
- [21] GUEDRI K, FRIH H, CHETTOUM A, et al. Chronic Restraint Stress Induced Neurobehavioral Alterations and Histological Changes in Rat [J]. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 2017, 9(2): 123-129.
- [22] YE F, DONG M C, XU C X, et al. Effects of Different Chronic Restraint Stress Periods on Anxiety- and Depression-Like Behaviors and Tryptophan-Kynurenine Metabolism along the Brain-Gut Axis in C57BL/6N Mice [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2024, 965: 176301.
- [23] YIRMIYA R, RIMMERMAN N, RESHEF R. Depression as a Microglial Disease [J]. *Trends in Neurosciences*, 2015, 38(10): 637-658.
- [24] VEGA-RIVERA N M, ORTIZ-LÓPEZ L, GRANADOS-JUÁREZ A, et al. Melatonin Reverses the Depression-Associated Behaviour and Regulates Microglia, Fractalkine Expression and Neurogenesis in Adult Mice Exposed to Chronic Mild Stress [J]. *Neuroscience*, 2020, 440: 316-336.
- [25] ALI T, RAHMAN S U, HAO Q, et al. Melatonin Prevents Neuroinflammation and Relieves Depression by Attenuating Autophagy Impairment through FOXO3a Regulation [J]. *Journal of Pineal Research*, 2020, 69(2): e12667.
- [26] LAMTAI M, ZGHARI O, AZIRAR S, et al. Melatonin Modulates Copper-Induced Anxiety-Like, Depression-Like and Memory Impairments by Acting on Hippocampal Oxidative Stress in Rat [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2022, 45(4): 1707-1715.
- [27] ALI T, BADSHAH H, KIM T H, et al. Melatonin Attenuates D-Galactose-Induced Memory Impairment, Neuroinflammation and Neurodegeneration via RAGE/NF-K B/JNK Signaling Pathway in Aging Mouse Model [J]. *Journal of Pineal Research*, 2015, 58(1): 71-85.
- [28] MAURIZ J L, COLLADO P S, VENEROSO C, et al. A Review of the Molecular Aspects of Melatonin's Anti-Inflammatory Actions: Recent Insights and New Perspectives [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54(1): 1-14.
- [29] KUMAR J, HALDAR C, VERMA R. Melatonin Ameliorates LPS-Induced Testicular Nitro-Oxidative Stress (iNOS/TNFA) and Inflammation (NF-kB/COX-2) via Modulation of SIRT-1 [J]. *Reproductive Sciences*, 2021, 28(12): 3417-3430.
- [30] SÁNCHEZ A, CALPENA A C, CLARES B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 16981-17004.

责任编辑 王新娟