

慢性社会应激模型的构建及其对雄鼠生殖健康影响的研究

姚基伟¹, 张全超², 王秀娟², 李前伟¹, 付卫华¹, 谌小维², 鄢俊安¹, 李为兵^{1△}

(1. 第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所, 重庆 400038; 2. 第三军医大学脑研究中心, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 构建慢性社会应激模型, 探究慢性社会应激对雄性 C57BL/6 小鼠生殖健康的影响。**方法** 将 C57BL/6 小鼠分成应激组和对照组; 应激组予以慢性社会应激 25 d 后, 通过社会交互作用的行为学实验和体质量变化评估应激模型的构建状况, 并对比两组小鼠生殖腺质量、精子计数等指标评估生殖健康的影响。**结果** 慢性社会应激结束后, 通过社会交互作用的行为学实验, 发现应激组小鼠在行为上具有明显社会逃避行为; 同对照组相比应激组小鼠生殖腺质量、精子数目均明显降低。**结论** 慢性社会应激可以损伤雄鼠生殖功能, 主要表现在生殖腺萎缩、精子数目减少等。

[关键词] 慢性社会挫败应激; 生殖健康; 社会交互作用; 生殖腺**[中图分类号]** R339.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)13-1738-03**Primary research of chronic social stress model construction and its impact on male reproductive health**Yao Jirwei¹, Zhang Quanchao², Wang Xiujuan², Li Qianwei¹, Fu Weihua¹, Chen Xiaowei², Yan Junan¹, Li Weibing^{1△}

(1. Research Institute of Urological Surgery of PLA, Southwest Hospital; 2. Brain

Research Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To construct the chronic social stress model and to investigate its effects on the reproductive health in male C57BL/6 mice. **Methods** 25 male C57BL/6 mice were randomly divided into the stress group (15 cases) and the control group (10 cases). The stress group was suffered from chronic social defeat stress for 25 d. Then the social interaction behavior test was performed and the changes of body weight were measured for evaluating the stress model construction situation. Moreover the sperm count and the weight of sexual gland were compared between the two groups for evaluating their influence on the reproductive health. **Results** After chronic social stress, the social interaction behavior test found that mice in the stress group had obvious social escape behavior, the average gonad weight and sperm number in the stress group were significantly declined compared with the control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The experiment results indicate that chronic stress could impair the male reproductive function, which are mainly manifested by the gonad atrophy, reduced number of sperm, etc.

[Key words] chronic social stress defeat model; reproductive health; social interaction test; gonad

男性的生殖健康呈逐年下降趋势, 男性不育症的发生率逐年增高^[1]; 近 50 年来全球男性的精子密度下降了 40%, 精液量下降了 19%^[2]。一项针对重庆 3 000 多名健康男性的精液质量调查研究发现, 近 61.1% 的健康男性的精液质量参数中有一项指标存在异常^[3], 且与环境、心理健康(社会压力)、生活习惯等相关^[4]。对男性生殖健康损害的众多因素中, 慢性社会应激(压力)对男性生殖健康影响的研究仍屈指可数。因此, 本研究通过构建慢性社会应激模型模拟社会压力状态, 评估其对雄性小鼠生殖健康的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物 8~9 周龄清洁级雄性(SPF 级)C57BL/6 小鼠和 3~4 月龄雌性 FVB/N 小鼠均购自第三军医大学大坪医院动物中心; 保证充足饮食饮水, 室温(22±1)℃, 日光灯照明 7:00~19:00, 应激时间为 18:00~20:00, 行为学评价时间为 14:00~17:30。

1.2 药品与试剂 0.1 M PBS 溶液、0.1% 戊巴比妥钠、多聚甲醛(Sigma)。

1.3 实验方法

1.3.1 慢性社会挫败应激模型 慢性社会挫败应激模型的构

建方法按照文献[5-6]。16 只成年雄性 FVB/N 小鼠(体质量大于 40 g)被用于作为“攻击鼠”; 将 25 只 C57BL/6 小鼠分为应激组(15 只)和对照组(10 只), 每天相同时段内将应激组 C57BL/6 小鼠作为“入侵者”放入单独饲养的 FVB/N 小鼠的笼内, 进行身体接触 10 min。10 min 后使用透明有孔的有机玻璃板(自制)将 2 只小鼠隔开进行心理应激 24 h。第 2 天将 C57BL/6 小鼠放入另一只 FVB/N 小鼠所在的大号鼠笼, 依次循环, 使应激持续 25 d。应激 20 d 后, 即可对 C57BL/6 小鼠进行行为学评价。对照组则使用相同的鼠笼饲养, 2 只对照组 C57BL/6 小鼠成对隔开。

1.3.2 社会交互作用实验 社会交互作用的实验设计按照文献[6]报道进行。社会交互实验分为两个阶段, 每个阶段 2.5 min。实验在 42 cm×42 cm×42 cm(长×宽×高)旷场装置内进行, 并设定交互作用区域和远端的两个角落区域, 在交互区域内放置一个 10 cm×6 cm×10 cm(长×宽×高)的铁笼(自制)。第一阶段将 C57BL/6 小鼠随机放置在旷场装置的正中央, 面对交互区域内的小笼子(笼内不放置 FVB/N 小鼠), 记录 C57BL/6 小鼠在装置内的运动情况, 记录并分析交互作用区域停留时间、角落内停留时间和运动轨迹。第二阶段, 操作

同第一阶段,但在交互区域内的小笼子内放置 1 只 FVB/N 小鼠。录制的视频采用自制软件进行分析。

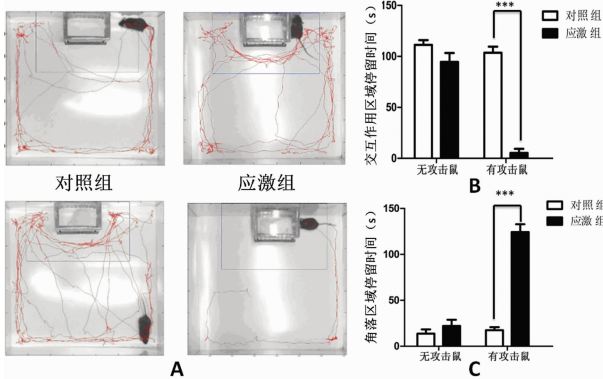
1.3.3 体质量和生殖腺质量的称量 每 5 天对应激组和对照组 C57BL/6 小鼠进行体质量称量和记录。经过 25 d 的应激训练后,分离睾丸、附睾和附睾尾,用高精度天平称量并记录。

1.3.4 制备精子悬液和精子计数 利用 C57BL/6 小鼠的附睾尾内的精子来制备精子悬液。通过运用血细胞计数板(精益公司)在光学显微镜下进行精子计数。按照细胞计数板的操作进行计数。精子计数的计算依照之前的文献进行计算^[7]。精子数目=计数板五个格子内精子数目×50 000×100(细胞数目/mL)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

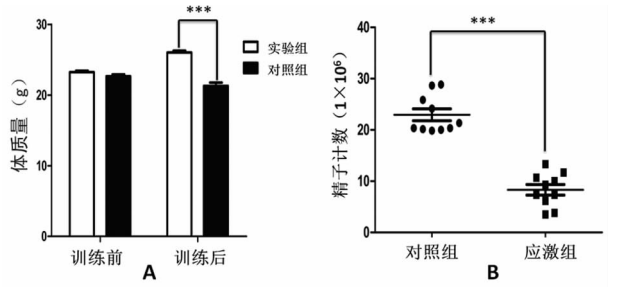
2.1 慢性社会应激模型影响小鼠社会交互作用 在社会交互作用的第一阶段,对照组和应激组小鼠在交互作用区域和角落的停留时间差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1B 和 1C),且两组小鼠的运动轨迹相似(图 1A),说明两组小鼠的运动能力无明显差别。在社会交互作用第二阶段,在交互作用区域的小铁笼内放置了 FVB/N 小鼠,应激组 C57BL/6 小鼠在交互作用的区域停留时间明显减少($P < 0.01$),而在远端的两个角落区域停留时间显著增长($P < 0.01$)(图 1B 和 1C),提示应激组小鼠表现出明显的社会逃避抑郁行为。同时,在实验过程中可以清楚地发现应激组 C57BL/6 小鼠在发现 FVB/N 小鼠后,表现出明显的恐惧反应并迅速逃离至远端角落;而对照组 C57BL/6 小鼠则表现为频繁且主动地接触 FVB/N 小鼠(图 1A)。



A:左侧为对照组小鼠的运动轨迹图,右侧为应激组小鼠的运动轨迹图;上面的两幅图的小笼子内无“攻击鼠”,下面的两幅图的小笼子内有“攻击鼠”;B:无“攻击鼠”时,对照组和应激组小鼠在交互作用区域(小笼子周围的区域)和角落区域的运动时间无差异($P > 0.05$);有“攻击鼠”存在时,两组在交互作用区域和角落区域的运动时间有差异($P < 0.01$)。

图 1 社会交互作用行为学实验

2.2 慢性社会应激影响体质量和生殖腺的质量 通过应激前后体质量的对比,发现应激组($n=10$)和对照组($n=10$)在训练前体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2A);而经过 25 d 的慢性社会应激后,应激组平均体质量明显减轻。慢性应激也可以使小鼠睾丸和附睾的脏器系数下降,提示应激组小鼠睾丸的质量、附睾的质量下降(表 1)。



A:应激模型构建前后实验组与对照组体质量的变化对比;B:应激组和对照组的精子计数。

图 2 慢性社会应激影响体质量和精子计数的影响

表 1 体质量和生殖腺重量及脏器系数变化($\bar{x} \pm s$)

参数	对照组($n=10$)	应激组($n=10$)	<i>P</i>
训练后体质量(g)	25.680±0.198	21.320±0.596	0.000
睾丸质量(g)	0.193±0.002	0.135±0.008	0.000
附睾质量(g)	0.050±0.001	0.034±0.002	0.001
睾丸/体质量(mg/g)	7.500±0.082	6.295±0.286	0.001
附睾/体质量(mg/g)	1.950±0.072	2.566±0.069	0.004

2.4 慢性社会应激对精子计数的影响 经过 25 d 的慢性社会应激后,对应激组和对照组小鼠进行了精子数目的评估。统计后,发现大部分的对照组小鼠精子数目均明显高于应激组($P < 0.01$)(图 2B),对照组小鼠精子数目的平均值为 $(22.95 \pm 1.15) \times 10^6$ 个/mL,而应激组小鼠精子数目的平均值为 $(8.32 \pm 1.03) \times 10^6$ 个/mL,提示慢性应激对附睾尾内精子数目的影响明显。

3 讨论

慢性社会应激被公认为抑郁症的重要发生原因之一^[8],但与其与生殖功能的关系仍不明朗。目前,慢性应激的研究主要集中在中枢神经系统^[9],然而对外周靶器官的研究相对较少;存在研究报道的有慢性应激对肠易激综合征的研究^[10],以及慢性应激对女性生殖系统损伤的研究^[11]等。在慢性应激对于男性生殖功能损伤的报道也并不多,且存在一定的争议,有些报道提示慢性应激可损害雄性生殖健康^[12]:主要表现在精子数目减少、畸形率上升、精子活力降低,雄激素分泌减少,性欲减退等现象上^[13];而有些研究则表示慢性应激对雄性生殖没有影响,选择科学可靠的慢性应激模型成为了明确该科学问题的关键。因此,慢性社会挫败应激模型是认可度高的慢性应激模型,成为了我们最佳的选择。通过社会交互行为学实验和体质量变化的评估,均表明本研究成功构建了慢性社会挫败应激模型。

本课题组采用慢性社会挫败应激模型来研究慢性应激对雄性生殖功能的损害,强度相对其他常见的慢性应激模型高。因此,所带来的影响可能会更加明显:对比两组的体质量可见,应激组小鼠体质量增加缓慢甚至呈负增长;通过行为学实验发现,应激组小鼠的焦虑状态处于较高水平,社会逃避行为十分明显;在对生殖健康的影响上则表现在附睾尾精子数目的下降,且生殖腺出现了明显萎缩等。研究结果与上述应激损伤雄性生殖功能的报道相一致,为慢性社会应激损伤雄性生殖功能提供了有力证据。

目前,越来越多的研究发现,心境障碍乃至抑郁症均可对男性生殖健康带来不利影响^[14]。同时,有报道提示不孕不育夫妇处于高度的焦虑和应激状态^[15],更加不利于病情的治疗,甚至进入到应激-生殖功能损伤-不育-应激的恶性循环中。因此,对慢性应激与生殖功能关系的研究也同样可以指导临床中不育症的治疗。

综上所述,慢性应激在引发心境障碍、乃至抑郁症的同时,也会对雄性生殖系统产生不良影响。慢性社会挫败应激模型为研究慢性应激对中枢和外周靶器官的影响提供了可靠的模型构建方法,为进一步深入研究慢性应激对生殖系统损伤的机制提供了有利支持。下一步将对应激引发雄性生殖功能损伤的机制进行研究,寻找相应的药物治疗靶点和干预措施。

参考文献

- [1] 李宏军. 加强对男性不育的认识及诊治规范化[J]. 中华泌尿外科杂志, 2013, 34(6): 406-409.
- [2] Nordkap L, Joensen UN, Blomberg M, et al. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders; Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 355(2): 221-230.
- [3] Li YF, Lin H, Ma MF, et al. Semen quality of 1 346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China[J]. *Human Reproduction*, 2009, 24(2): 459-469.
- [4] Li Y, Li YF, Zhou N, et al. Socio-psycho-behavioural factors associated with male semen quality in China; results from 1 346 healthy men in Chongqing[J]. *J Fam Plann Reprod Health Care*, 2013, 39(2): 102-110.
- [5] Wang XD, Su YA, Wagner KV, et al. Nectin-3 links CRHR1 signaling to stress-induced memory deficits and spine loss[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(6): 706-715.
- [6] Golden SA, Covington HE, Berton D, et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(8): 1183-1191.
- [7] Parhizkar S, Yusoff MJ, Dollah MA. Effect of phaleria macrocarpa on sperm characteristics in adult rats[J]. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3(2): 345-352.
- [8] Berton O, Colleen A. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress[J]. *Science*, 2006, 311(5762): 864-868.
- [9] Vaishnav K, Eric J, Nestler I. The molecular neurobiology of depression[J]. *Nat Rev*, 2008, 455(7215): 894-902.
- [10] Xu D, Gao J, Gilliland M, et al. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(2): 484-496.
- [11] Hamilton LD, Meston CM. Chronic stress and sexual function in women[J]. *J Sex Med*, 2013, 10(10): 2443-2454.
- [12] Hardy MP, Gao HB, Dong Q, et al. Stress hormone and male reproductive function[J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 322(1): 147-153.
- [13] Józaków P, Medraś M. Psychological stress and the function of male gonads[J]. *Endokrynol Pol*, 2012, 63(1): 44-49.
- [14] Kocetak P, Chudek J, Naworska B, et al. Psychological disturbances and quality of life in obese and infertile women and men[J]. *Int J Endocrinol*, 2012: 236217.
- [15] Gürhan N, Akyüz A, Atıcı D, et al. Association of depression and anxiety with oocyte and sperm numbers and pregnancy outcomes during in vitro fertilization treatment [J]. *Psychol Rep*, 2009, 104(3): 796-806.

(收稿日期: 2014-09-08 修回日期: 2015-02-13)

(上接第 1737 页)

- damage: a multicenter prospective cohort study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(3): 246-255.
- [10] Doi K, Katagiri D, Negishi K, et al. Mild elevation of urinary biomarkers in prerenal acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(10): 1114-1117.
 - [11] Ralib AM, Pickering JW, Shaw GM, et al. Test characteristics of urinary biomarkers depend on quantitation method in acute kidney injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(2): 322-333.
 - [12] Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury [J]. *Ann Intern Med*,

2008, 148(11): 819-810.

- [13] Singer E, Elger A, Elitok S, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes [J]. *Kidney Int*, 2011, 80(4): 405-414.
- [14] Siew ED, Ware LB, Bian A, et al. Distinct injury markers for the early detection and prognosis of incident acute kidney injury in critically ill adults with preserved kidney function[J]. *Kidney Int*, 2013, 84(5): 786-794.
- [15] 赵元明. 血清和尿液 NGAL 在急、慢性肾损伤中的变化及临床价值[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(3): 484-486.

(收稿日期: 2014-10-28 修回日期: 2015-02-11)