

慢性束缚应激对小鼠毛囊细胞生长周期的影响

刘楠¹, 马占波², 傅文青¹, 张国兴¹, 王琳辉¹, 王晓娟¹,

(1.苏州大学基础医学与生物科学学院,江苏 苏州 215123;

2.河北省衡水市东亚百殿风医院,河北 衡水 053000)

【摘要】 目的:探讨慢性束缚应激诱导的皮肤氧化应激对小鼠毛囊生长周期的影响。方法:以慢性束缚法建立小鼠心理应激模型,观察行为学和皮肤组织形态学改变,检测血浆皮质醇水平,皮肤组织中硫代巴比妥酸反应产物(TBARS)水平,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力。结果:与控制组相比,束缚组小鼠运动距离显著减少($P<0.05$),血浆皮质醇和皮肤 TBARS 水平显著上升($P<0.05$, $P<0.001$),SOD、GSH-Px 活力显著降低($P<0.05$, $P<0.001$),毛囊生长期明显延迟;束缚加抗氧化剂组小鼠,皮肤组织 TBARS 水平、GSH-Px 活力与控制组无明显差异,可部分逆转毛囊生长期延迟。结论:慢性束缚应激引起的皮肤组织氧化应激导致小鼠毛囊生长期延迟。

【关键词】 慢性束缚应激;氧化应激;毛囊周期

中图分类号: R395.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3611(2012)06-0769-04

Influence of Chronic Restraint Stress on Anagen Stage in Skin of Mouse

LIU Nan, MA Zhan-bo, FU Wen-qing, ZHANG Xing-guo, et al

School of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow University, Soochow 215123, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects of oxidative stress induced by chronic restraint stress on hair cycle of mouse. **Methods:** Chronic restraint stress was used to establish a psychological stress model in mouse, to observe the change of behavior and skin tissue morphology, and detect the cortisol levels in plasma, thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) levels, superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) activity in skin. **Results:** Compared with the control group, mouse movement distance of restraint group decreased significantly ($P<0.05$), plasma cortisol and skin TBARS levels increased significantly ($P<0.05$, $P<0.001$), SOD and GSH-Px activity decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.001$), anagen stage was significantly delayed; Compared with the control group, TBARS levels and GSH-Px activity had no significant difference in mouse of restraint added anti-oxidants group, delay of anagen was partly reversed.

Conclusion: The oxidative stress induced by chronic restraint stress of skin tissue delayed anagen in hair cycle of mouse.

【Key words】 Chronic restraint stress; Oxidative stress; Hair cycle

脱发是一系列可见性毛发减少疾病的总称,大多数类型的脱发是由于毛囊周期异常和毛囊形态学改变引起的^[1]。应激一直被认为是脱发的诱因之一,但一直未有确凿证据证明应激可以抑制毛发生长^[2]。Aoki 等发现慢性足底电击可以导致 C57 小鼠毛囊静止期延长^[3],而 Arck 用 24 小时的噪声刺激使 C57 小鼠毛囊退行期提前^[4],这些研究结果都表明应激确实可以影响毛囊周期,但确切机制尚不清楚。氧化应激与皮肤疾病密切相关,皮肤抗氧化系统的抑制导致活性氧自由基(ROS)堆积而对细胞产生损伤,外界环境或皮肤本身都可以产生 ROS,而作为人体最外层的皮肤是活性氧自由基的主要靶器官^[5]。以往研究中建立动物心理应激模型多采用急性应激^[6],或躯体成分较大的足底电击^[3],不能较好的模拟人类慢性情绪应激反应。慢性束缚应激可以造成动物焦虑和抑郁状态且躯体应激成分相对较小,并可以

引起动物全身多器官的氧化应激损伤^[7,8],故本研究采用了慢性束缚应激法。实验中先用脱毛法诱导小鼠背部毛囊同步进入生长期,然后给予慢性束缚应激,分别从肉眼和形态学两方面观察毛囊生长周期的改变并检测皮肤中硫代巴比妥酸反应产物(TBARS)水平、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶活力,并通过观察抗氧化剂的作用来探讨皮肤氧化应激损伤是否为心理应激抑制毛囊生长的机制之一。

1 对象与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 C57BL/6N 小鼠 42 只(雄性,体重 15~20g),由苏州大学实验动物中心提供。所有动物在温度 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 50~60%,白昼/黑夜周期为 12h/12h(7:00~19:00 照明)条件下适应环境 7 天后开始实验,每 3 天更换一次笼舍和垫料。实验中除应激期间外均自由饮水及摄食。

1.2 慢性束缚应激和腹腔注射 Tempol

采用脱毛法诱导小鼠毛囊同步进入生长期^[4],使用松香和石蜡(重量 1:1)混合物脱去小鼠背部毛发,面积约 2cm×5cm(从颈到尾)。慢性束缚装置按文献所述自制^[9],将 50ml 离心管管壁不同部位钻出直径 3mm 左右的小孔,以防止小鼠窒息。将小鼠头朝向管底放入离心管内后封闭管口,头端稍高于尾端放置,每天 6h(10:00~16:00),束缚期间禁食禁水,6h 后将小鼠恢复自由。从脱毛后第一天开始应激,周期为 18 天。

Tempol(4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基)是一种稳定的,能够自由透过细胞膜的抗氧化剂,是 SOD 的类似物,小鼠腹腔注射 Tempol 的最大耐受量为 275mg/kg 体重^[10]。将 Tempol 粉剂(美国 sigma 公司)溶于双蒸水中制得浓度为 20g/L 的 Tempol 溶液,本实验选择注射剂量为 200mg/kg 体重。将所有小鼠随机分为:①控制组(14 只):不进行应激处理,但在束缚组应激期间也不给予饮水及饲料;②束缚组(14 只):每天 6h 束缚应激,不进行腹腔注射;③束缚+Tempol(14 只):每天 6h 束缚应激,每只小鼠按 200mg/kg 体重腹腔注射 Tempol 溶液。

1.3 行为学评估和体重测量

从束缚第 1 天起每天测量小鼠体重并记录,束缚应激周期结束后,使用开场实验仪器(成都泰盟科技有限公司)记录小鼠 3min 内运动距离并录像。在整个检测过程中,房间需保持安静。

1.4 标本采集

脱毛后第 9 天小鼠背部毛囊处于生长晚期,控制组小鼠皮肤呈现深灰色^[11],每组以摘眼球取血法(麻醉下)随机处死 7 只小鼠,取得血液肝素抗凝,离心,取上清液-80℃保存。切取小鼠背部相同位置皮肤组织约 2cm×5cm,将靠近颈部约 1cm×1cm 立即用 4%福尔马林(pH7.4)固定,常规方法脱水,石蜡包埋。因颈部毛囊周期变化先于其他部位^[4],故选取此部位作组织学观察。剩余皮肤-80℃保存。脱毛后第 19 天,以同样方法处理剩余小鼠。

1.5 血浆皮质醇浓度测定

血液样本使用小鼠糖皮质激素 Elisa 试剂盒(苏州碧云天生物技术研究所在所)测定血浆皮质醇浓度。

1.6 测定 TBARS 水平、SOD、GSH-Px 活性

按照试剂盒要求制备组织匀浆,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(苏州碧云天生物技术研究所在所)定量蛋白,使用 TBARS 测定试剂盒(美国 BioAssay Systems 公司)测定皮肤组织 TBARS 水平。使用 SOD、GSH-

Px 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定皮肤组织 SOD、GSH-Px 活力。

1.7 肉眼观察皮肤颜色变化

每天应激前拍照记录小鼠背部皮肤颜色变化(日本松下公司 DMC-FS15 型相机)。利用 ImageJ 软件对小鼠皮肤颜色进行灰度分析。

1.8 组织学观察

取皮肤纵切面 HE 染色切片,根据 Arck 等的方法对毛囊进行分期并评分^[4],生长期为 1-4 分(anagen I-II:1 分;anagen IIIa-IIIb:2 分;anagen IIIc-IV:3 分;anagen V-VI:4 分),退行期为 1-4 分(catagen I-II:1 分;catagen III-IV:2 分;以此类推)。每个切片选取十个视野(×100),计数总毛囊个数,然后对单个毛囊评分,总分相加后再除以总毛囊个数求得毛囊平均分。

2 结 果

2.1 行为学评估和体重

与控制组比较,束缚组和束缚+Tempol 组小鼠在放入开场箱后 3min 内的运动距离显著降低(见表 1)。体重增长显著减慢(见表 2)。

表 1 不同应激天数各组小鼠运动距离

组别	运动距离 (cm)	
	9 天	19 天
控制组	3026.15±386.65	2918.14±365.55
束缚组	2013.39±147.95*	1477.45±213.49**
束缚+Tempol	1969.60±134.19*	1741.03±57.67*

注:与控制组比较,* $P<0.05$,与束缚组比较,** $P<0.05$;下同。

表 2 不同应激天数各组小鼠体重

组别	体重(g)				
	0 天	4 天	14 天	19 天	
控制组	20.51±0.71	20.88±0.62	22.30±0.65	24.05±0.54	24.26±0.69
束缚组	20.06±0.47	18.79±0.42*	19.67±0.41*	20.96±0.48*	21.19±0.47*
束缚+Tempol	20.89±0.37	18.90±0.45*	20.56±0.44*	20.77±0.85*	21.14±0.83*

表 3 不同应激天数各组小鼠血浆皮质醇水平

组别	血浆皮质醇水平 (ng/L)	
	9 天	19 天
控制组	38.83±2.05	40.00±0.59
束缚组	48.79±3.28*	46.73±2.26*
束缚+Tempol	48.01±2.23*	47.71±1.81*

2.2 血浆皮质醇水平

以控制组均值为 100%,求得其他各组血浆皮质醇水平百分数。与控制组比较,束缚组和束缚+Tempol 组血浆皮质醇水平明显升高(见表 3)。

2.3 TBARS 水平、SOD、GSH-Px 活力

与控制组比较,脱毛后第 9 天和第 19 天束缚组皮肤 TBARS 水平均显著升高($P<0.05$),SOD、GSH-

Px 活力显著降低($P<0.05$, $P<0.001$), 束缚+Tempol 组皮肤 TBARS 水平、GSH-Px 活力与控制组无明显差异, SOD 活力则显著下降($P<0.001$)。与束缚组相比较, 束缚+Tempol 组 TBARS 水平显著降低($P<0.001$)。见表 4、5、6。

表 4 不同应激天数各组小鼠皮肤组织 TBARS 水平

组别	TBARS 水平 ($\mu\text{mol/L}/100\mu\text{g protein}$)	
	9 天	19 天
控制组	6.50 ± 0.73	6.73 ± 0.92
束缚组	$10.56 \pm 1.36^*$	$14.77 \pm 1.55^*$
束缚+Tempol	$5.71 \pm 1.11^\#$	$2.41 \pm 1.06^\#$

表 5 不同应激天数各组小鼠皮肤组织 SOD 活性

组别	SOD 活性 ($\text{U}/100\mu\text{g protein}$)	
	9 天	19 天
控制组	15.88 ± 0.32	15.66 ± 1.09
束缚组	$13.64 \pm 0.23^*$	$12.14 \pm 1.13^*$
束缚+Tempol	$12.62 \pm 0.69^*$	$8.14 \pm 1.95^*$

表 6 不同应激天数各组小鼠皮肤组织 GSH-Px 活性

组别	GSH-Px 活性 ($\text{U}/100\mu\text{g protein}$)	
	9 天	19 天
控制组	482.00 ± 61.34	499.96 ± 29.27
束缚组	$316.62 \pm 24.39^*$	$280.02 \pm 34.99^*$
束缚+Tempol	$427.45 \pm 53.22^\#$	$481.66 \pm 87.26^\#$

2.4 肉眼观察皮肤颜色变化

肉眼观察可见, 脱毛后第 9 天, 与控制组相比, 束缚组皮肤呈粉色, 灰度值显著升高($P<0.001$); 与束缚组相比较, 束缚+Tempol 组皮肤明显偏灰, 灰度值显著降低($P<0.05$)。第 19 天, 控制组皮肤已恢复粉色, 与束缚组相比束缚组皮肤颜色仍为黑色, 灰度值显著降低($P<0.001$), 与束缚组相比束缚+Tempol 组皮肤呈灰色, 灰度值显著升高($P<0.05$)。见表 7。

表 7 不同应激天数各组小鼠皮肤灰度率

组别	皮肤灰度率 (%)	
	9 天	19 天
控制组	23.61 ± 1.77	33.38 ± 1.52
束缚组	$44.99 \pm 1.29^*$	$10.88 \pm 0.56^*$
束缚+Tempol	$37.44 \pm 1.49^\#$	$18.22 \pm 1.01^\#$

表 8 不同应激天数各组小鼠毛囊平均分

组别	毛囊平均分	
	9 天	19 天
控制组	2.88 ± 0.12	5.52 ± 0.29
束缚组	$1.71 \pm 0.17^*$	$4.15 \pm 0.13^*$
束缚+Tempol	$2.80 \pm 0.19^\#$	$5.04 \pm 0.17^\#$

2.5 组织形态学观察

脱毛后第 9 天, 控制组毛囊多处于生长晚期(生长期 IV-VI), 毛囊平均分接近 3 分; 束缚组毛囊多

处于生长早期(生长期 I-IIIa), 毛囊平均分显著低于控制组($P<0.05$); 束缚+Tempol 组毛囊多处于生长中期(生长期 IIIc-IV), 毛囊平均分显著高于束缚组($P<0.05$)。脱毛后第 19 天, 控制组毛囊多处于退行中期(退行期 IV-VI), 毛囊平均分接近 6 分; 束缚组毛囊多处于生长晚期(生长期 V-VI), 毛囊平均分仍显著低于控制组($P<0.05$); 束缚+Tempol 组毛囊多处于退行早期(退行期 I-III), 毛囊平均分显著高于 CRS 组($P<0.05$)。见表 8。

3 讨 论

应激可以引起机体内分泌、免疫、自主神经三大系统的改变, 作为机体最外层的皮肤不仅接受外界刺激, 同时也接受来自机体自身的生理性和情绪性应激源的刺激^[3]。应激引起皮肤病变的详细机制尚不清楚, 但氧化应激已经公认是众多皮肤疾病的重要发病机制, 可以诱导或加重诸如红斑、水肿、光老化、皱纹、过敏反应、炎症及皮肤癌等疾病^[5]。还有报道在斑秃病人的头皮组织中, TBARS 水平、SOD、GSH-Px 活力均明显升高^[12]。而心理应激可以导致身体多器官发生氧化应激, 提示氧化应激可能是心理应激导致皮肤病变的一个重要机制。本研究利用慢性束缚法建模, 观察到束缚组小鼠皮肤 TBARS 水平显著升高, SOD、GSH-Px 活力显著降低。TBARS 涵盖了大部分氧化损伤产生的醛酮类物质, 因而被认为是衡量氧化应激所导致的脂质过氧化反应较好的指标。SOD 和 GSH-Px 是重要的抗氧化系统, 能够抑制氧化反应和分解氧化产物, 二者活力降低是造成氧化产物堆积进而对组织细胞造成损伤的重要原因。本实验还观察到给予抗氧化剂 Tempol 腹腔注射后, 小鼠皮肤 TBARS 水平显著降低的同时, SOD 活力也随之显著降低, 可能因为 Tempol 与 SOD 结构相似而形成竞争性抑制有关。肉眼和形态学观察也发现束缚组毛囊生长期延迟, 并且发现在给予腹腔注射抗氧化剂后能够改善, 与实验室检测结果相一致。这进一步证明了氧化应激有可能是心理应激对毛囊周期产生影响的一条重要途径。

C57BL/6N 小鼠是观察和研究毛囊周期的理想模型动物, 其皮肤颜色呈周期样变化, 休止期为粉色, 生长期逐渐变为黑色, 至退行期皮肤呈灰色, 至静止期重新变为粉色。因此根据皮肤颜色可粗略地对毛囊进行分期^[11]。脱毛后第 9 天当控制组毛囊进入生长晚期时, 模型组毛囊仍处于生长早期。腹腔注射 Tempol 可以部分的逆转应激引起的毛囊生长期

延迟。第 19 天时结果与第 9 天相似,控制组毛囊周期仍领先于模型组。此结果说明慢性束缚应激导致了毛囊生长期的整体延迟,既静止期延长,参照 Aoki 等人的研究结果,提示慢性束缚应激具有与足底电击相同的抑制毛囊生长的作用。本实验中观察束缚应激可影响脱毛后第 1 个生长周期,而足底电击只对脱毛后第 2 个生长周期有作用^[3],故毛囊对束缚刺激更加敏感。

慢性束缚应激可以造成动物的抑郁和焦虑状态,与足底点击法相比心理和情绪应激成分更为突出而躯体应激成分相对较小,可以较好的模拟人类慢性焦虑情绪和抑郁状态^[13]。动物血清皮质醇水平显著升高,提示动物处于应激状态,行为学评估结果显示在开场实验初始 3min 内束缚组动物运动距离明显下降,提示其处于抑郁状态,证明了本次实验的动物模型是成功的。

参 考 文 献

- 1 Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol Med*, 2001, 7(7): 293-301
- 2 Peters EM, Arck PC, Paus R. Hair growth inhibition by psychoemotional stress: A mouse model for neural mechanisms in hair growth control. *Exp Dermatol*, 2006, 15(1): 1-13
- 3 Aoki E, Shibasaki T, Kawana S. Intermittent foot shock stress prolongs the telogen stage in the hair cycle of mice. *Exp Dermatol*, 2003, 12(4): 371-377
- 4 Arck PC, et al. Stress inhibits hair growth in mice by induction of premature catagen development and deleterious

- perifollicular inflammatory events via neuropeptide substance P-dependent pathways. *Am J Pathol*, 2003, 162(3): 803-814
- 5 Trouba KJ, et al. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(4): 665-673
- 6 Rahman MM, et al. Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(16): 7545-7550
- 7 Zafir A, Banu N. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46(1): 53-58
- 8 Sahin E, Gumuslu S. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2007, 144(4): 342-347
- 9 Yin D, et al. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J Exp Med*, 2000, 191(8): 1423-1428
- 10 Hahn SM, et al. Tempol, a stable free radical, is a novel murine radiation protector. *Cancer Res*, 1992, 52(7): 1750-1753
- 11 Muller-Rover S, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(1): 3-15
- 12 Akar A, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the scalp of patients with alopecia areata. *J Dermatol Sci*, 2002, 29(2): 85-90
- 13 Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, 33(7): 1089-1098

(收稿日期:2012-07-19)

(上接第 884 页)

新的起点,因而其关注点集中在新的学习和生活,而非原专业对现在的影响。只要转系生能够从主观上积极接纳新专业,合理认识在新环境中所面临的问题,并且相信自己有能力克服困难,迎接挑战,不管在新专业的学习方面还是新班集体融入方面,将都能够实现良好适应。与此同时,对于客观因素,比如本研究中的转系决策支持度,是否会通过影响主观因素来影响转系生的适应性,或者是否存在其他客观因素来影响和预测转系生的适应情况,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 方乐,姜宝法,沈丁萍,孔媛媛.某高校转专业学生孤独感与抑郁状况的配对研究. *中国心理卫生杂志*, 2007, 21(11): 751

- 2 崔岳.高校转专业本科学习生活的现状与问题——北师大转专业学生的调查. *大学·研究与评价*, 2009, 8: 74-79
- 3 张炜伟,张景焕,许燕.男护生学校适应状况分析. *中国临床心理学杂志*, 2011, 19(3): 374-376
- 4 唐文清.大学生专业适应性量表编制及其应用.西南大学硕士论文, 2007
- 5 李飞,杨坤.中学生学校归属感现状及培养. *心理健康教育*, 2006, 9
- 6 胡斌,皮薇薇.关注转校(转专业)学生学习状况,激发学生学习动机. *文教资料*, 2008, 14: 177-181
- 7 付海玲.大学生归因方式、情感幸福感和自我价值感的关系研究.河北师范大学硕士学位论文, 2007
- 8 周勇,董奇.学习动机、归因、自我效能感与学生自我监控学习行为的关系研究. *心理发展与教育*, 1994, 10(3): 30-31

(收稿日期:2012-05-04)