

Operations of Mother-Pup Separation and the Effects on HPA Axis in Rat

Liyun Chen

School of Psychology, Southwest University, Chongqing
Email: 247692966@qq.com

Received: Oct. 27th, 2015; accepted: Nov. 10th, 2015; published: Nov. 23rd, 2015

Copyright © 2015 by author and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The paper described different operations of mother-pup separation, including early handling and maternal separation. Maternal separation was further categorized into maternal deprivation, daily maternal separation and occasional maternal separation; it was also categorized into maternal separation and early deprivation. Finally, a brief summary of the effects of mother-pup separation on HPA axis activity was also provided.

Keywords

Rat, Early Handling, Maternal Separation, Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA)

实验鼠的母婴分离操作及对HPA轴的影响

陈丽芸

西南大学心理学部, 重庆
Email: 247692966@qq.com

收稿日期: 2015年10月27日; 录用日期: 2015年11月10日; 发布日期: 2015年11月23日

摘要

文章对实验鼠母婴分离操作的主要形式进行了描述, 主要包括早期处置和母爱分离; 并根据分离操作的

主要特点，如分离频率和幼鼠是否单独分离，对实验鼠母爱分离的方式做了进一步的分类，包括母爱剥夺，重复母爱分离和非重复母爱分离；以及母爱分离和早期剥夺。最后文章简要探讨了早起处置和母爱分离对压力应对的主要机制——下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的影响。

关键词

实验鼠，早期处置，母爱分离，下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质轴

1. 引言

自 1951 年 John Bowlby *母爱关怀与心理健康*(*Maternal Care and Mental Health*)的论述之后，对母婴关系的研究引起了人们的广泛关注，比如哈洛的“铁娘子”实验，安斯沃斯的陌生情境测验。在这些研究中，母婴分离是构成实验的重要操作部分，不良的母婴分离有可能导致幼儿焦虑，抑郁，营养不良，影响幼儿的健康成长(Casler, 1961)。目前已有许多基于实验鼠这一动物模型的母婴分离实验，研究者通过将处于哺乳期的幼鼠与母鼠分离，从而研究这一早期经历对幼鼠认知、记忆、学习能力发展的影响(Marco et al., 2013; Tata et al., 2015)，以及与焦虑、抑郁、成瘾等行为的关系(Ladd et al., 2004; Llorente et al., 2007; Nylander & Roman, 2013)。然而纵观不同研究，大鼠母婴分离的操作各不一样，比如分离持续的时间，分离的频率等。这不仅使不同实验的研究结果难以进行直接比较，也让有心想做动物分离实验的研究者一时难以抉择，因此对不同的母婴分离操作进行梳理就显得很有必要。另外，由于母婴分离往往涉及对下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)这一压力应对机制的影响，以及该机制对内分泌、行为等方面所起到的作用，因此文章也将对 HPA 轴的作用进行适当探讨。

2. 母婴分离

新生幼鼠的生存与生长主要依赖于母鼠所提供的温暖，营养与庇护，尤其是生命开始的前几天或前几周，因此这段时期的母婴联系就显得至关重要(Meaney et al., 1993)。大鼠的母婴分离一般指发生在哺乳期间，即自幼鼠出生到断乳这之间的 21 天，母鼠与幼鼠的分离。根据每次分离所持续的时间，可以将分离大致分为两类，即早期处置(Early Handling, EH)与母爱分离(Maternal Separation, MS)。

2.1. 早期处置

早期处置这一分离操作最早出现在 1956 年 Levine 等人的研究中，它的一般操作方法是將幼鼠与母鼠每天分离一段时间，分离的时间较短，最多不超过 30 分钟。分离时，有的研究将幼鼠作为个体单独(isolated)放在另一个鼠笼里(Clausing et al., 1997)，有的则是将整笼(litter)幼鼠一起进行分离(Kalinichev et al., 2001)，这些都被称为早期处置，只是前者除了与母鼠的分离外还包括了与同胞幼鼠的分离。

早期处置通常被视为一种良性的母婴分离操作，因为即使在自然状态下，母鼠与幼鼠也并没有一直保持密切联系，早期处置分离所持续的时间与正常状态下母鼠与幼鼠逐渐减少的互动时间相对一致(Leon et al., 1978; Jans & Woodside, 1990)；另一方面，母鼠与幼鼠短暂的分离可能会使母鼠对分离鼠表现出更多的舔舐行为(Liu et al., 1997)，因此分离时间较短的早期处置对幼鼠所产生的影响通常是积极的。比如，早期处置的分离鼠往往具有更好的压力应对能力，在旷场试验(open field)和高架十字迷宫(elevated plus maze)中都表现出了较低的焦虑水平和更多的探索行为(Ader & Grotta, 1968; Daly, 1973; Vallee et al., 1997; Wakshlak & Weinstock, 1990)。总体而言，不同研究的早期处置操作方法相对一致，而且研究所发现的分离对幼鼠神经内分泌与行为所造成的影响也大体相同。

2.2. 母爱分离

相较于早期处置在操作与结论上的一致性,不同研究对母爱分离的操作程序则相当纷乱,差异很大,几乎很难找出两个研究团队使用的是同一种母爱分离操作。母爱分离的分离时间比早期处置要长,宽泛地讲,但凡在哺乳期间进行分离,不管是重复分离还是只分离一次,只要分离时间在1个小时乃至24个小时的都被称为母行爱分离,比如在 Imanaka 等人(2008)的研究中幼鼠与母鼠每天分离1个小时,在 Kalinichev 等人(2001)的研究中母鼠与幼鼠每天分离3个小时,而在 Burke 等人(2013)的研究里母鼠与幼鼠分离了24个小时。操作上的不同很容易导致研究结果的不同,因此为了方便研究间的比较,找出分离中对结果具有重要影响的因素,对母爱分离进适当的分类是很有必要的,这里主要参照 Lehmann & Feldon (2000)与 Pryce & Feldon (2003)的观点。

2.2.1. Lehmann 对母爱分离的分类

Lehmann 从分离频率的角度对母爱分离作了进一步的分类,即单次母爱分离与重复母爱分离;重复母爱分离又分为连续重复母爱分离(daily maternal separation, DMS)与非连续重复母爱分离(occasional maternal separation, OMS)。

常见的单次母爱分离的分离时间多为一整天24小时,这24小时的母爱分离也被称为母爱剥夺(maternal deprivation, MD),通常发生在幼鼠出生后的第4天到第14天之间。在这段时期,幼鼠大脑发展迅速,对外部刺激处于低反应状态,被称为压力不应期(stress hyporesponsive period, SHRP) (Walker et al., 1986)。其中幼鼠出生后第9天的母爱剥夺经常作为研究精神分裂症的动物模型,比如 Ellenbroek 等人(1998, 1995)通过前脉冲抑制(prepulse inhibition, PPI)范式和潜伏抑制(latent inhibition, LI)范式发现,母爱剥夺会导致分离鼠的精神分裂样注意缺陷。

连续重复母爱分离的操作模式与早期处置类似,即将处于哺乳期的幼鼠每天与母鼠分离一段时间,只是分离的时间更长,通常在1个小时以上;而非连续重复母爱分离则是在哺乳期间断续地,非连续地将幼鼠与母鼠分离,分离时间也是在1个小时以上。显然1个小时以上的分离时间又是一个很大的选择范围,有研究认为至少要2个小时的分离才能够立即引起压力应对机制下丘脑-垂体-肾上腺轴的反应(Kuhn et al, 1990);而8个小时以上的分离所产生的影响才足够持久(Rosenfeld et al., 1992)。因此分离时间的选择是一个需要注意的重要因素。

2.2.2. Pryce 对母爱分离的分类

Pryce 以幼鼠是否单独分离作为分类依据。他认为,不论幼鼠与母鼠分离的时间是1个小时还是24个小时,也不管是重复分离还是只分离一次,只要幼鼠与母鼠分离时与其他同胞幼鼠一起放置在另一个笼中,就称为母爱分离(MS);而当幼鼠被单个放在笼中,不仅与母鼠也与同胞幼鼠分离时,就被称为早期剥夺(early deprivation, ED)。

Pryce 对母爱分离的分类与 Lehmann 的分类并不冲突,两者互为补充。Lehmann 对每次分离所持续的时间进行了考虑,将1到24个小时的时间区间进行了简要划分,而 Pryce 则从分离的概念入手,区分了母爱分离与早期剥夺的不同。

由于母爱分离操作的这些差异性,不难理解为何不同研究即使采用了相同的行为实验结果却仍然不同的原因。比如, Kaneko 等人(1994)认为母爱分离会降低实验鼠在旷场中的焦虑水平,而在高架十字迷宫中则没有这种现象;相对的, Wigger 和 Neumann (1999)却得出了分离鼠在高架迷宫中焦虑水平的提高。再比如, Ogawa 等人(1994)以及 Wigger 都发现了分离鼠自主活动的减少,而 von Hoersten 等人(1993)与 Kaneko 却得出了相反的结果。尽管研究结论不一,多数研究者仍认为母爱分离对幼鼠产生的影响是负性的,这是因为分离时间的延长,使得分离鼠所得到的营养,温暖,与母鼠的接触都要少,更有可能对幼

鼠的生长发展产生不良影响。

3. 下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质(HPA)轴

新生幼鼠的生存与生长主要依赖于母鼠所提供的温暖, 营养与庇护, 母婴分离对幼鼠来说无疑是一种应激, 而 HPA 轴的激活是机体对应激的最重要的适应性反应。在压力情境下, 下丘脑(hypothalamus)会释放促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF), 刺激垂体(pituitary)释放促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic, ACTH), 从而促使肾上腺(adrenal)皮质合成和分泌糖皮质激素类固醇(glucocorticosteroid, GC), 动员机体能量和保持内环境稳定。另一方面, GC 还具有负反馈调节的作用, 抑制 CRF 与 ACTH 分泌。

早期处置对分离鼠 HPA 轴的影响比较小, 在面对应激时, HPA 轴的激活处于低反应状态, CORT 与 ACTH 的释放峰值相较于非分离控制组低, 负反馈机制的调节作用更高, 压力反应能够更快恢复到基础水平, 表现出更好的压力应对能力(Meaney et al., 1989), 就如之前所提到的, 在旷场试验和高架十字迷宫中都表现出了较低的焦虑水平和更多的探索行为。与早期处置对 HPA 轴的影响不同, 母爱分离鼠在面对压力时 HPA 轴的激活处于高反应状态, 血浆中的 ACTH 与 CORT 水平显著提高, 压力反应持续时间更长, 这可能与负反馈调节机制的受损有关, CORT 水平过高很容易使幼鼠大脑受损, 从而对幼鼠认知、行为等方面造成影响(Sapolsky & Meaney, 1986)。由于分离操作的差异性以及不同压力刺激的特点, 母爱分离对 HPA 轴活动所造成的影响仍需要进一步的研究确定。

4. 总结

随着社会的发展, 人们对下一代的成长与培养越发重视, 对母婴关系的研究日益受到社会关注, 其中包括留守儿童这一我国面临的重大社会课题, 因此对亲子分离的研究不容忽视。动物母婴分离的研究是对留守儿童、孤儿院儿童以及由于疾病住院等因素造成的亲子分离或母婴分离研究的重要补充, 可以增进分离对幼儿认知、情绪、行为发展等方面所造成的影响的认识, 进一步确定生理机制上的变化和主要影响因素。

规范和统一的动物母婴分离实验能够更加有效地对相关研究进行比较, 促进研究的进展。文章以实验鼠为研究对象, 探讨了实验鼠母婴分离的操作模式及其主要影响机制, 对早期处置和母爱分离这两种主要的分离方式进行了论述, 并对母爱分离的操作做了进一步的分类, 文中同时就母婴分离这一早期应激事件对下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴这一压力应对机制的影响进行了简要描述。

参考文献 (References)

- Ader, R., & Grotta, L. J. (1968). Effects of Early Experiences on Emotional and Physiological Reactivity in the Rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66, 264-268. <http://dx.doi.org/10.1037/h0026344>
- Burke, N. N., Llorente, R., Marco, E. M., Tong, K., Finn, D. P., Viveros, M. P., & Roche, M. (2013). Maternal Deprivation Is Associated with Sex-Dependent Alterations in Nociceptive Behavior and Neuroinflammatory Mediators in the Rat Following Peripheral Nerve Injury. *The Journal of Pain*, 14, 1173-1184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.05.003>
- Casler, L. (1961). Maternal Deprivation: A Critical Review of the Literature. *Monographs of the Society for Research in Child Development*, 26, 1-64. <http://dx.doi.org/10.2307/1165564>
- Clausing, P., Mottles, H. K., Opitz, B., & Kormann, S. (1997). Differential Effects of Communal Rearing and Prewearing Handling on Open-Field Behavior and Hot-Plate Latencies in Mice. *Behavioural Brain Research*, 82, 179-184. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)80987-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(97)80987-4)
- Daly, M. (1973). Early Stimulation of Rodents: A Critical Review of Present Interpretations. *British Journal of Psychology*, 64, 435-460. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2044-8295.1973.tb01370.x>
- Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (1995). Maternal Separation Reduces Latent Inhibition in the Conditioned Taste Aversion Paradigm. *Neuroscience Research Communications*, 17, 27-33.

- Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (1998). The Neurodevelopment Hypothesis of Schizophrenia: Clinical Evidence and Animal Models. *Neuroscience Research Communications*, 22, 127-136.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6769\(199805/06\)22:3<127::AID-NRC1>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1520-6769(199805/06)22:3<127::AID-NRC1>3.0.CO;2-X)
- Imanaka, A., Morinobu, S., Toki, S., Yamamoto, S., Matsuki, A., Kozuru, T., & Yamawaki, S. (2008). Neonatal Tactile Stimulation Reverses the Effect of Neonatal Isolation on Open-Field and Anxiety-Like Behavior, and Pain Sensitivity in Male and Female Adult Sprague-Dawley Rats. *Behavioural Brain Research*, 186, 91-97.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.039>
- Jans, J., & Woodside, B. C. (1990). Nest Temperature: Effects on Maternal Behavior, Pup Development, Interaction with Handling. *Developmental Psychobiology*, 23, 519-523. <http://dx.doi.org/10.1002/dev.420230607>
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., & Holtzman, S. G. (2001). Repeated Neonatal Maternal Separation Alters Morphine-Induced Antinociception in Male Rats. *Brain Research Bulletin*, 54, 649-654.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00485-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00485-3)
- Kaneko, W. M., Riley, E. P., & Ehlers, C. L. (1994). Behavioral and Electrophysiological Effects of Early Repeated Maternal Separation. *Depression*, 2, 43-53. <http://dx.doi.org/10.1002/depr.3050020106>
- Kuhn, C. M., Pauk, J., & Schanberg, S. M. (1990). Endocrine Responses to Mother-Infant Separation in Developing Rats. *Developmental Psychobiology*, 23, 395-410. <http://dx.doi.org/10.1002/dev.420230503>
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., & Plotsky, P. M. (2004). Long-Term Adaptations in Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor mRNA and Negative Feedback on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Following Neonatal Maternal Separation. *Biological Psychiatry*, 55, 367-375.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.007>
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-Term Biobehavioral Effects of Maternal Separation in the Rat: Consistent or Confusing? *Reviews in the Neurosciences*, 11, 383-408. <http://dx.doi.org/10.1515/REVNEURO.2000.11.4.383>
- Leon, M., Croskerry, P. G., & Smith, G. K. (1978). Thermal Control of Mother Infant Contact in Rats. *Physiology & Behavior*, 21, 793-811. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(78\)90021-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(78)90021-5)
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., & Meaney, M. J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, 277, 1659-1662.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5332.1659>
- Llorente, R., Arranz, L., Marco, E. M., Moreno, E., Puerto, M., Guaza, C., De la Fuente, M., & Viveros, M. P. (2007). Early Maternal Deprivation and Neonatal Single Administration with a Cannabinoid Agonist Induce Long-Term Sex-Dependent Psychoimmunoendocrine Effects in Adolescent Rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 636-650.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.04.002>
- Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J., & Viveros, M. P. (2013). Maternal Deprivation Effects on Brain Plasticity and Recognition Memory in Adolescent Male and Female Rats. *Neuropharmacology*, 68, 223-231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.014>
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Sharma, S., Viau, V., & Sarrieau, A. (1989) Neonatal Handling Alters Adrenocortical Negative Feedback Sensitivity and Hippocampal Type II Glucocorticoid Receptor Binding in the Rat. *Neuroendocrinology*, 50, 597-604. <http://dx.doi.org/10.1159/000125287>
- Meaney, M. J., Bhatnagar, S., Diorio, J., Laroque, S., Francis, D., O'Donnell, D., Shanks, N., Sharma, J., & Viau, V. (1993). Molecular Basis for the Development of the Individual Differences in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stress Response. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 13, 321-347. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00711576>
- Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the Rodent Maternal Separation Model a Valid and Effective Model for Studies on the Early-Life Impact on Ethanol Consumption? *Psychopharmacology*, 229, 555-569.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00213-013-3217-3>
- Ogawa, T., Mikuni, M., Kuroda, Y., Muneoka, K., Mori, K. J., & Takahashi, K. (1994). Periodic Maternal Deprivation Alters Stress Response in Adult Offspring: Potentiates the Negative Feedback Regulation of Restraint Stress-Induced Adrenocortical Response and Reduces the Frequencies of Open Field-Induced Behaviors. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 49, 961-967. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90250-X](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(94)90250-X)
- Pryce, C. R., & Feldon, J. (2003). Long-Term Neurobehavioural Impact of the Postnatal Environment in Rats: Manipulations, Effects and Mediating Mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 57-71.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00009-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00009-5)
- Rosenfeld, P., Wetmore, J. B., & Levine, S. (1992). Effects of Repeated Maternal Separations on the Adrenocortical Response to Stress of Prewaning Rats. *Physiology & Behavior*, 52, 787-791.
[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90415-X](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(92)90415-X)
- Sapolsky, R. M., & Meaney, M. J. (1986). Maturation of the Adrenocortical Stress Response: Neuroendocrine Control Mechanisms and the Stress Hyporesponsive Period. *Brain Research*, 396, 64-76.

[http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173\(86\)90010-X](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173(86)90010-X)

- Tata, D. A., Markostamou, I., Ioannidis, A., Gkioka, M., Simeonidou, C., Anogianakis, G., & Spandou, E. (2015). Effects of Maternal Separation on Behavior and Brain Damage in Adult Rats Exposed to Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Behavioural Brain Research*, 280, 51-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.033>
- Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., & Maccari, S. (1997). Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling Induces Low Anxiety in Adult Offspring: Correlation with Stress-Induced Corticosterone Secretion. *Journal of Neuroscience*, 17, 2626-2636.
- von Hoersten, S., Dimitrijevic, M., Markovic, B. M., & Jankovic, B. D. (1993). Effect of Early Experience on Behavior and Immune Response in the Rat. *Physiology & Behavior*, 54, 931-940. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90305-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(93)90305-Y)
- Wakshlak, A., & Weinstock, M. (1990). Neonatal Handling Reverses Behavioral Abnormalities Induced in Rats by Prenatal Stress. *Physiology & Behavior*, 48, 289-292. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90315-U](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(90)90315-U)
- Walker, C. D., Perrin, M., Vale, W., & Rivier, C. (1986). Ontogeny of the Stress Response in the Rat: Role of the Pituitary and the Hypothalamus. *Endocrinology*, 80, 1177-1179. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-118-4-1445>
- Wigger, A., & Neumann, I. (1999). Periodic Maternal Deprivation Induces Gender-Dependent Alterations in Behavioral and Neuroendocrine Responses to Emotional Stress in Adult Rats. *Physiology & Behavior*, 66, 293-302. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00300-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00300-X)