



海马内微量注射 K252a 对大鼠行为学及 抑郁样经典指标的影响

孟盼^{1,2}, 朱青³, 张秀丽^{1,2}, 向韵^{1,2}, 王宇红^{1,2}, 杨蕙⁴, 雷昌^{1,2}

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 湖南长沙 410208;
3. 湖南省肿瘤医院, 湖南长沙 410013; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007)

【摘要】 目的 海马内微量注射 K252a, 研究其对大鼠行为学及抑郁样经典指标的影响, 拟建立一种新型抑郁症动物模型。方法 SD 大鼠随机分为 5 组, 即空白对照组、假手术组、慢性应激抑郁模型组、海马内微量注射 K252a 组、海马内微量注射 K252a 联合慢性应激组。采用 Open field 实验、糖水消耗实验、Morris 水迷宫测定大鼠行为学的影响, ELISA 法检测大鼠血清单胺递质含量的变化, 放射免疫法观察大鼠血浆 CRH、ACTH、CORT 含量的变化, Western blotting 观察大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 蛋白表达的变化。结果 与空白对照组比较, CUMS 组大鼠的活动量、糖水消耗量、学习记忆能力显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), HPA 轴功能亢进 ($P < 0.01$), 血清单胺递质水平降低 ($P < 0.01$), BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达下调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 DMSO 组上述指标差异无统计学意义; 与 DMSO 比较, K252a 组、K252a + CUMS 组活动量、糖水消耗量、学习记忆能力显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 血清单胺递质水平下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), HPA 轴功能显著上升 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 CUMS 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠上述指标差异无显著性; 与 K252a 组比较, K252a + CUMS 组大鼠上述指标差异无显著性。结论 从行为学、血液学、分子生物学的不同角度分析表明, 此模型与经典的慢性应激抑郁模型在表面效率、结构效率、功能效率上具有极大的相似性, 可为病因研究和抗抑郁药物筛选提供一个可供选择的研究技术平台。

【关键词】 抑郁症; 模型, 动物; K252a; 神经营养障碍

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 04-0026-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.04.005

Changes of behavior and depression-like classic indicators after hippocampal microinjection of K252a

MENG Pan^{1,2}, ZHU Qing³, ZHANG Xiu-li^{1,2}, XIANG Yun^{1,2}, WANG Yu-hong^{1,2}, Yang Hui⁴, LEI Chang^{1,2}

(1. Hunan University of Traditional Chinese medicine, Changsha, 410208, China; 2. Training Base, Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry, Changsha, 410208; 3. Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha 410013; 4. First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007)

【Abstract】 Objective To study the changes of behavior and depression-like classic indicators after hippocampal

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (81403387); 湖南省教育厅一般项目 (14C0862; 15C1038); 湖南省科技厅重点项目 (2015DK3003); 中医内科学省部共建教育部重点实验室开放基金 (ZYNK201503)。

【作者简介】 孟盼 (1987 -), 女, 博士, 主要从事神经精神疾病的机制研究及中医药防治。E-mail: mengpan0822@163.com。

【通讯作者】 王宇红 (1965 -), 女, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 中药神经药理。E-mail: wyh107@126.com。

microinjection of K252a, and to establish a new animal model of depression. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups, namely the control group, sham group, chronic stress depression model group, hippocampal of K252a microinjection group, and hippocampal microinjection K252a plus chronic stress group. Open field experiments, sucrose consumption test, and Morris water maze behavioral assay were used to assess the behavioral changes in the rats. ELISA was used to detect the plasma monoamine neurotransmitter, radioimmunoassay was used to determine the plasma CRH, ACTH, CORT contents, and western-blotting was performed to observe the protein expression of BDNF, CREB, ERK1/2, and BCL-2 in the hippocampus. **Results** Compared with the control group, the amount of activity, sugar consumption, learning and memory abilities were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), also the serum monoamine neurotransmitters were decreased ($P < 0.01$), HPA axis function was improved ($P < 0.01$), and the expression of BDNF, CREB, ERK1/2, BCL-2 decreased in the CUMS group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but there was no significant difference in the DMSO group. Compared with the DMSO group, the activity, consumption of sucrose, learning and memory ability were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the HPA axis function was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the serum monoamine neurotransmitters decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the BDNF, CREB, ERK1/2, BCL-2 expressions in the hippocampus were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in the K252a group and K252a + CUMS group. Compared with the CUMS group, the K252a group and K252a + CUMS group did not show significant changes in these parameters. Compared with the K252a group, these indicators were not significantly changed in the K252a + CUMS group. **Conclusions** The results of behavior, hematology, and molecular biology analysis show that this model has a great similarity to the classical model of CUMS in surface validity, construct validity, and functional validity. It may provide an alternative investigative technology platform for basic research and antidepressant drug screening.

【Key words】 Depression; Models, animal; K252a; Neurotrophic disorders

抑郁症 (depression) 是一种严重危害人类身心健康的全球性的疾病。随着社会经济的发展,生活节奏的加快,抑郁症的发病率逐年增长,因此防治抑郁症的创新药物研发已成为医药科学发展的重要内容。近年来,抑郁症基础研究已经超出经典的“单胺类递质”及“下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 轴”假说,并进行受体后机制及神经营养障碍机制研究^[1]。这些研究发现细胞内信号转导相关蛋白或靶基因对于研究抑郁症的发病机制及抗抑郁药物的研发具有重要的价值^[2],其中最重要的就是脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), BDNF 通过酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase, TrkB) 信号影响抑郁症的病理生理结构和神经可塑性的改变已得到广泛公认^[3]。

动物模型模拟人类疾病状态的程度以及评价方法的可靠性和准确性直接影响实验研究结果的价值^[4]。现有的抑郁症动物模型创新性地融合了比较行为学及其经典的发病机制,然而目前尚未见基于“神经营养障碍”假说的抑郁症相关动物模型,为该假说的深入研究及挖掘带来了障碍。基于此,本实验采用海马微量注射 BDNF 受体阻断剂 K252a,研究其对大鼠行为学及抑郁样经典指标的影响,并与经典的慢性温和不可预测性应激

(chronic unpredicted mild stress, CUMS) 抑郁模型进行比较,旨在得到一种新型的抑郁症动物模型。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 240 ~ 280g, 50 只, 由湖南斯莱科景达动物中心提供, 实验动物生产许可证: SCXK (湘) 2012 - 0004, 动物合格证号: HNASLKJ20140814。在光/暗周期为 12h/12h (光照时间 7:00 ~ 19:00) 的条件下饲养于笼中, 自由获得饲料和饮水 (使用许可证号: SYXK (湘) 2013 - 0005)。

1.2 试剂

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、cAMP 反应元件结合蛋白 (cyclic AMP response element binding protein, CREB) 一抗购自于 (英国 Abcam 公司); 胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)、抑凋亡蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 一抗购自于 (美国 Proteintech 公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京中杉金桥公司); Protein marker (美国 MBI Fermentas 公司); NC 膜 (美国 Millipore 公司); 羊抗兔 IgG-HRP 二抗 (北京中杉金桥公司); 皮质醇 (cortisol, CORT)、促肾上腺皮质激素

(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)放射免疫试剂盒(南京建成有限公司);5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)ELISA 试剂盒(上海酶联生物有限公司)。

1.3 仪器

超纯水仪(德国密理博公司);三用电热恒温箱(余姚市东方电工仪器厂);开野视频跟踪系统、Morris 水迷宫(西班牙 Panlab 公司);电泳仪(北京六一仪器厂);ELX800SNT 型酶标仪(美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);DYY-8 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂);DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);小型湿转仪、凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组

所有大鼠适应环境 3 d,期间进行 1% 蔗糖水训练,测定 6 pm~9 am 内大鼠 1% 蔗糖水摄入量。选取糖水摄入量相近的 50 只大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,即空白对照组(control);慢性应激抑郁模型组(CUMS);假手术组即海马内微量注射二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO);海马内微量注射 K252a;海马内微量注射 K252a 联合慢性应激(K252a + CUMS)。

2.2 各组处理方式及给药^[5]

空白对照组每笼 5 只饲养,不给予任何刺激;CUMS 组大鼠单笼孤养,每天随机给予不同刺激复制抑郁模型大鼠,包括:停食(24 h)、停水(24 h)、倾笼 45℃、夹尾(1 min)、4℃冰浴(15 min)、昼夜颠倒(24 h)、噪声(5 min),每天随机安排 1 种,平均每种刺激使用 3 次,共计 21 d。其它各组大鼠以 Bregma 点为中心,锁定大鼠海马的位置(AP-3.8mm, ML +/-.5mm, DV-2.5mm),埋入套管,用套管帽拧住,以备微量注射时注射器能够插入,各组术后给予青霉素腹腔注射 3 d,留待处理后的大鼠备用。埋入套管的动物分别在实验的第 1、7、14、21 天海马内微量注射相应药物,与此同时 CUMS 也在实验的第 1 天开始。DMSO 组大鼠海马内微量注射 1 μL DMSO;K252a 组大鼠海马内微量注射 1 μL 的

K252a(10 μg/μL),K252a 由 DMSO 溶液进行配置;K252a + CUMS 组在大鼠海马内微量注射 1 μL K252a(10 μg/μL)的同时联合慢性应激。

2.3 行为学检测

2.3.1 Open field 实验:立方敞箱,高 40 cm,长宽 80 cm,周壁、底面为黑色,用白线划分,以大鼠在 3 min 内穿越底面块数(四爪均进入的方格方可计数)为水平(locomotor activity)得分,以直立次数为垂直活动(rearing)得分(动物双足离开底面至动物双足放下为一次活动)。测定动物活动量的变化。

2.3.2 糖水消耗实验:动物单笼孤养,一个瓶装 1% 蔗糖水,一个瓶装纯净水,禁水 12 h 后,测定 6 pm~9 am 内大鼠 1% 蔗糖水摄入量。测定动物糖水消耗量的变化。

2.3.3 Morris 水迷宫测试:

(1)定位航行实验:训练试验:分别在试验的 17~21 d 进行 8 次航行实验的练习,即从 4 个不同的象限将大鼠面向池壁放入水中,如果 60 s 内大鼠未爬上平台,则将其牵引至平台处停留 20 s,在试验的第 22 天进行以下实验:每天上、下午各做 1 次,于平台正对的第二象限处,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台的持续时间(escape latency)。

(2)空间搜索实验:撤除平台由同一入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录其穿越目标象限的次数(crossing target),目标象限潜伏时间(Lat. T),在目标区域移动的百分比 D(%)。

2.4 HPA 轴内分泌相关指标测定

大鼠行为学测试结束后,动物禁食 24 h,10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔麻醉,腹主动脉取血,于肝素钠管中收集,2 500 r/min 离心 15 min,取血浆入 1.5 mL 离心管中,-80℃ 冰箱保存。严格按照放免试剂盒说明书测定血浆促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质酮(corticosterone, CORT)含量。

2.5 血清单胺递质含量测定

大鼠行为学测试结束后,动物禁食 24 h,10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔麻醉,腹主动脉取血,于促凝管中收集,3 000 r/min 离心 10 min,取血清入 1.5 mL 离心管中,-80℃ 冰箱保存,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行 NE、5-HT、DA 的检测。

2.6 脑标本的采集

大鼠行为学测试结束后,腹主动脉取血,然后取脑,剥离海马组织于液氮中速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

2.7 Western-blotting 检测相关蛋白

取海马组织,按每 mg 组织 5 μ L 比例加入 RIPA 裂解液,冰上匀浆,4°C、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液制备组织蛋白提取液,BCA 法测定其蛋白含量,保存待用。按照 Western-blotting 实验方法分别检测各组大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达量,其中以 β -actin 为内参。应用 ImageJ 图像处理软件对条带进行扫描,测量灰度值,计算各组目的蛋白的相对表达量,进行统计学分析。

2.8 数据分析

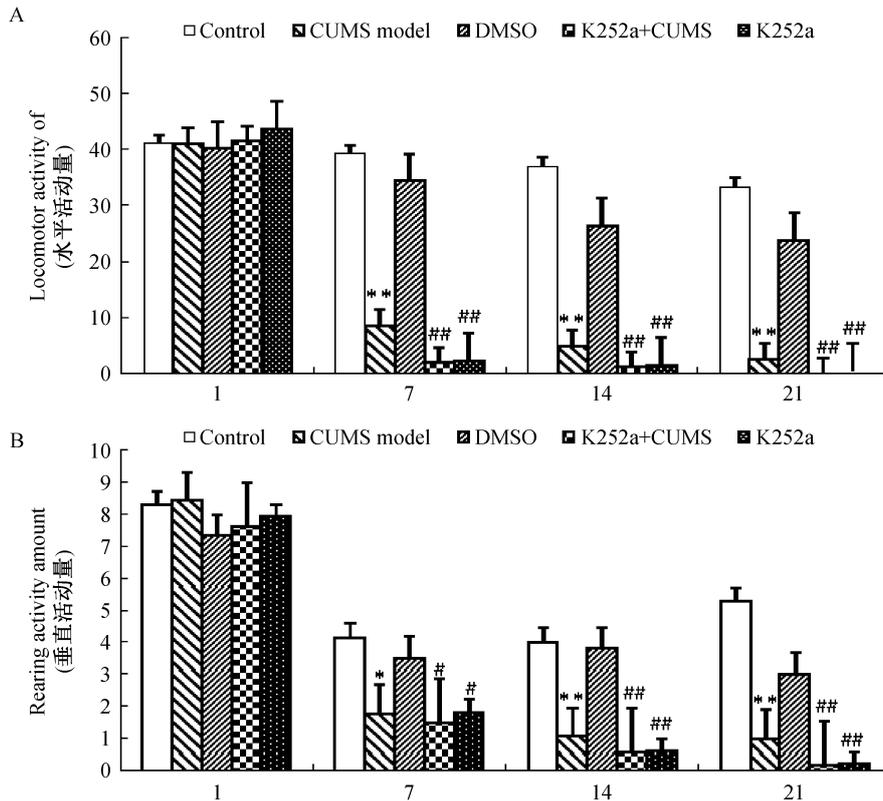
数据收集数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,采用 One-way-ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 行为学检测结果

3.1.1 Open field 测试结果:与空白对照组比较,DMSO 组大鼠的水平活动量、垂直活动量在第 7、14、21 天差异无显著性,CUMS 组大鼠的水平活动量、垂直活动量在第 7 天时开始下降 ($P < 0.05$);与 DMSO 组比较,K252a、K252a + CUMS 组大鼠的水平活动量、垂直活动量均在第 7、14、21 天下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 CUMS 组比较,K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠的水平活动量、垂直活动量轻度下降,但差异无显著性;与 K252a 组比较,K252a + CUMS 组大鼠第 21 天的水平活动量、垂直活动量轻度下降,但差异无显著性。结果见图 1,水平活动量为 A,垂直活动量见 B。

3.1.2 糖水消耗测试结果:与空白对照组比较,



与空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 DMSO 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与 CUMS 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$;与 k252a 组比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

注:Control(空白对照组);CUMS model(慢性应激抑郁模型组);DMSO(假手术组即海马内微量注射二甲亚砷);K252a(海马内微量注射 K252a);K252a + CUMS(海马内微量注射 K252 a 联合慢性应激)

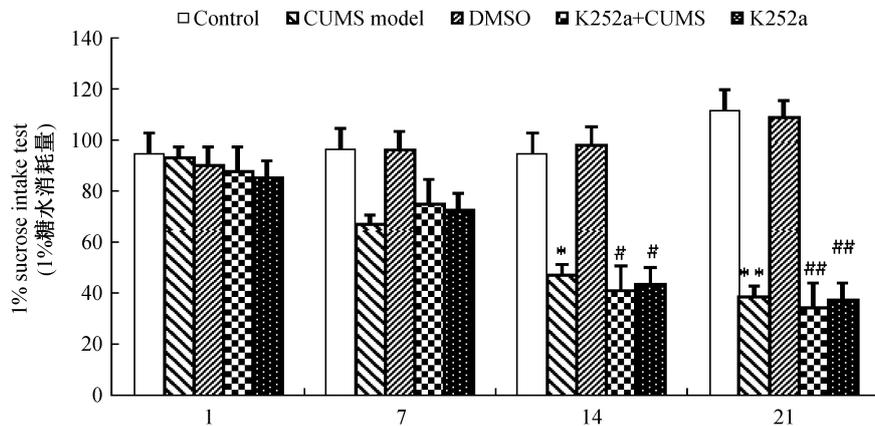
图 1 各组大鼠水平活动和垂直活动的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

* $P < 0.05$, vs. the control group, ** $P < 0.01$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the DMSO group; ## $P < 0.01$, vs. the DMSO group; ▲ $P < 0.05$, vs. CUMS group, ▲▲ $P < 0.01$, vs. the CUMS group; ■ $P < 0.05$, vs. the k252a group; ■■ $P < 0.01$, vs. the k252a group.

Fig. 1 Changes of locomotor activity and rearing of the rats in each group

DMSO 组大鼠的糖水消耗量在第 7、14、21 天差异无显著性, CUMS 组大鼠的糖水消耗量在第 14 天时开始下降 ($P < 0.05$); 与 DMSO 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠的糖水消耗量均在第 14、21 天下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 CUMS 组比较,

K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠的糖水消耗量轻度下降, 但差异无显著性; 与 K252a 组比较, K252a + CUMS 组大鼠的糖水消耗量轻度下降, 而差异无显著性。结果见图 2。



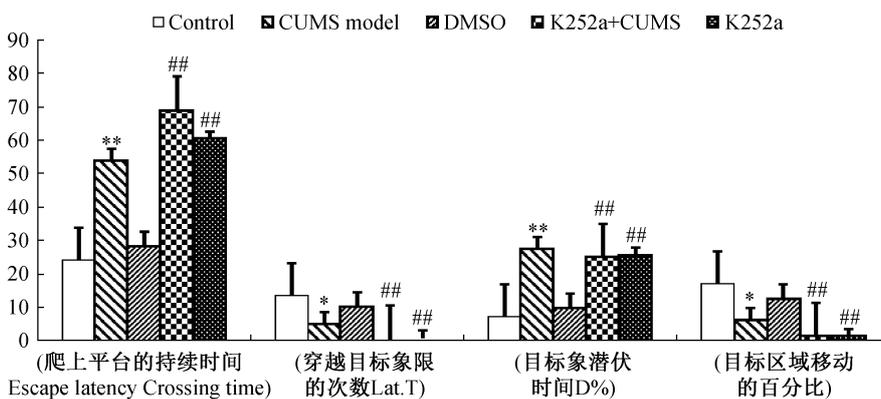
与空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DMSO 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 k252a 组比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

注: Control(空白对照组); CUMS model(慢性应激抑郁模型组); DMSO(假手术组即海马内微量注射二甲基亚砷); K252a(海马内微量注射 K252a); K252a + CUMS(海马内微量注射 K252 a 联合慢性应激)

图 2 各组大鼠糖水消耗量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

(* $P < 0.05$, vs control group, ** $P < 0.01$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the DMSO group, ## $P < 0.01$, vs. the DMSO group; ▲ $P < 0.05$, vs. the CUMS group, ▲▲ $P < 0.01$, vs. the CUMS group; ■ $P < 0.05$, vs. the k252a group; ■■ $P < 0.01$, vs. the k252a group.)

Fig.2 Changes of 1% sucrose intake of the rats in each group



与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DMSO 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 k252a 组比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

注: Control(空白对照组); CUMS model(慢性应激抑郁模型组); DMSO(假手术组即海马内微量注射二甲基亚砷); K252a(海马内微量注射 K252a); K252a + CUMS(海马内微量注射 K252 a 联合慢性应激)

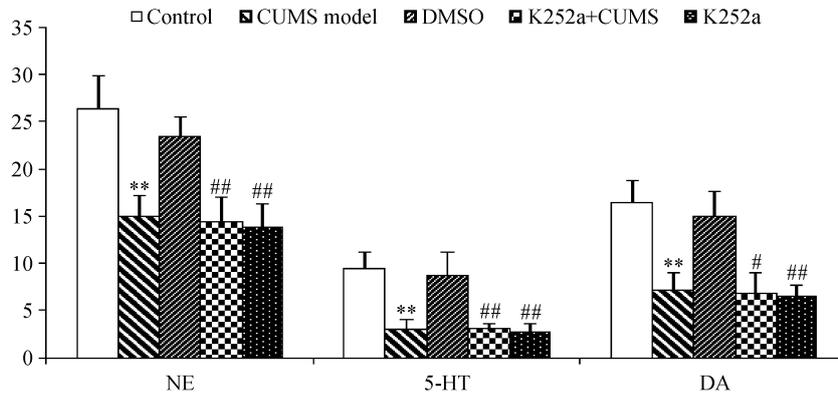
图 3 Morris 水迷宫测试各组大鼠学习记忆的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

(* $P < 0.05$, vs. the control group, ** $P < 0.01$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the DMSO group, ## $P < 0.01$, vs. the DMSO group; ▲ $P < 0.05$, vs. the CUMS group, ▲▲ $P < 0.01$, vs. the CUMS group; ■ $P < 0.05$, vs. the k252a group; ■■ $P < 0.01$, vs. the k252a group.)

Fig.3 The Morris water maze test of rats in each group

3.1.3 Morris 水迷宫测试结果:在第 21 天时,与空白对照组比较, DMSO 组大鼠的 escape latency、crossing target、Lat. T、D% 差异无显著性, CUMS 组大鼠的 escape latency、Lat. T 显著上升 ($P < 0.01$), crossing target、D% 下降 ($P < 0.05$); 与 DMSO 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠的 escape latency、Lat. T 显著上升 ($P < 0.01$), crossing target、

D% 下降 ($P < 0.01$); 与 CUMS 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠 escape latency 下降而差异无显著性, crossing target、Lat. T、D% 差异无显著性; 与 K252a 组比较, K252a + CUMS 组大鼠的 escape latency、crossing target、Lat. T、D% 差异无显著性。结果见图 3。



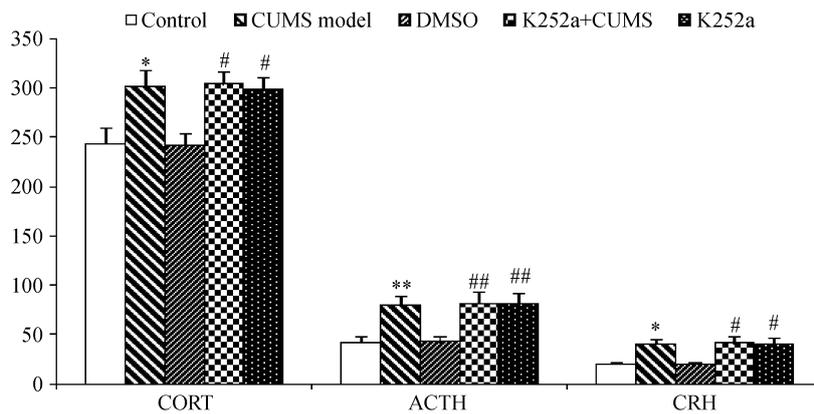
与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DMSO 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 k252a 组比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

注: Control(空白对照组); CUMS model(慢性应激抑郁模型组); DMSO(假手术组即海马内微量注射二甲亚砷); K252a(海马内微量注射 K252a); K252a + CUMS(海马内微量注射 K252a 联合慢性应激)

图 4 各组大鼠血清 NE、5-HT、DA 含量变化 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

(* $P < 0.05$, vs. the control group, ** $P < 0.01$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs the DMSO group, ## $P < 0.01$, vs. the DMSO group; ▲ $P < 0.05$, vs. the CUMS group, ▲▲ $P < 0.01$, vs. the CUMS group; ■ $P < 0.05$, vs. the k252a group; ■■ $P < 0.01$, vs. the k252a group.)

Fig. 4 Changes of NE, 5-HT, DA levels in the serum of rats in each group



与空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DMSO 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 k252a 组比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

注: Control(空白对照组); CUMS model(慢性应激抑郁模型组); DMSO(假手术组即海马内微量注射二甲亚砷); K252a(海马内微量注射 K252a); K252a + CUMS(海马内微量注射 K252a 联合慢性应激)

图 5 各组大鼠血浆 CORT、ACTH、CRH 含量变化 ($n = 10, \bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

(* $P < 0.05$, vs. the control group, ** $P < 0.01$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the DMSO group, ## $P < 0.01$, vs. the DMSO group; ▲ $P < 0.05$, vs. the CUMS group, ▲▲ $P < 0.01$, vs. the CUMS group; ■ $P < 0.05$, vs. the k252a group; ■■ $P < 0.01$, vs. the k252a group.)

Fig. 5 Changes of CORT, ACTH, and CRH levels in the plasma of rats in each group

3.2 血清单胺递质含量的检测结果

与空白对照组比较, DMSO 组大鼠血清 NE、5-HT、DA 水平差异无显著性, CUMS 组大鼠血清 NE、5-HT、DA 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 DMSO 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠的血清 NE、5-HT、DA 水平显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 CUMS 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠血清 NE、5-HT、DA 水平差异无显著性; 与 K252a 组比较, K252a + CUMS 组大鼠血清 NE、5-HT、DA 水平差异无显著性。结果见图 4。

3.3 血浆 HPA 轴相关指标的检测结果

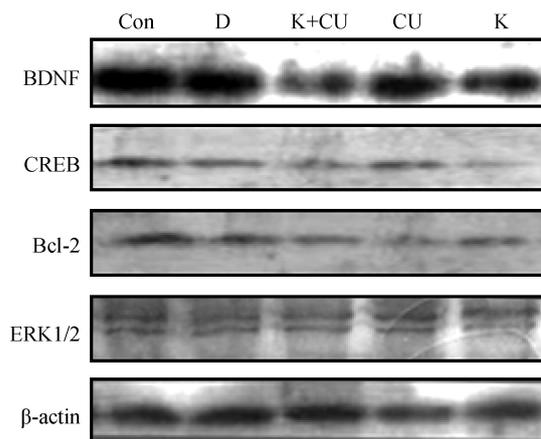
与空白对照组比较, DMSO 组大鼠血浆 ACTH、CRH、CORT 水平差异无显著性, CUMS 组大鼠血浆 ACTH、CRH、CORT 水平显著上升 ($P < 0.01$); 与 DMSO 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠的血浆 ACTH、CRH、CORT 水平显著上升 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 CUMS 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠血浆 ACTH、CRH、CORT 水平差异无显著性; 与 K252a 组比较, K252a + CUMS 组大鼠血浆 ACTH、CRH、CORT 水平差异无显著性。结果见图 5。

3.4 Western-blotting 检测海马相关蛋白表达的结果

与空白对照组比较, DMSO 组大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、Bcl-2 的表达差异无显著性, CUMS 大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 DMSO 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 CUMS 组比较, K252a 组、K252a + CUMS 组大鼠海马 BDNF、BCL-2 的表达降低而差异无显著性, CREB、ERK1/2 的表达差异无显著性; 与 K252a 组比较, K252a + CUMS 组大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达差异无显著性。结果见图 6、7。

4 讨论

抑郁症是情感性精神障碍的主要类型, 是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的综合征, 是发病率最高的精神疾病。据 WHO 公布的调查预计, 到 2020 年抑郁症将成为危害人类健康的第二大疾患, 仅次于缺血性心脏病, 将占全部疾病总负担的 6.4%^[6], 其对我国的国民健康及社会的危害正



注: Con(空白对照组); CU(慢性应激抑郁模型组); D(假手术组, 即海马内微量注射二甲亚砷); K(海马内微量注射 K252a 组); K + CU(海马内微量注射 K252a 联合慢性应激组)

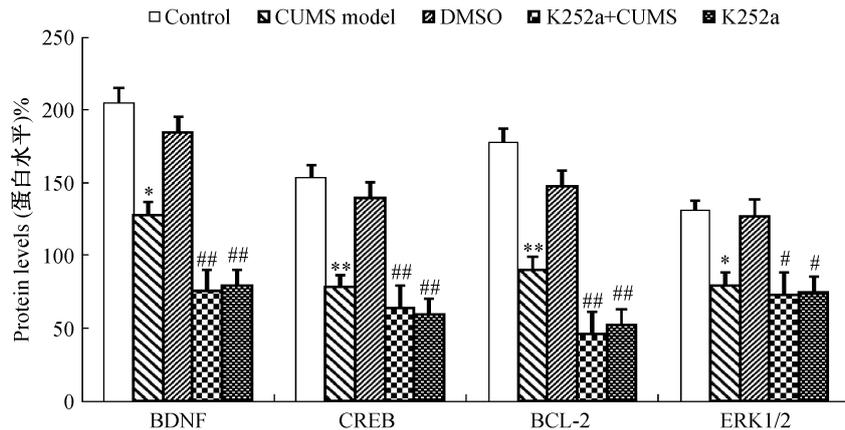
图 6 Western-blotting 检测海马 BDNF、CREB、BCL-2、ERK1/2 的条带图

Fig. 6 Detection of hippocampal BDNF, CREB, BCL-2, and ERK1/2 of the western blot strip chart

日益凸显。

抑郁症的机制研究和抗抑郁药的新药开发都离不开有效的抑郁症动物模型的建立, 目前常用的动物模型主要包括物理方法、化学方法、生物方法 3 大类, 如, 行为绝望模型、糖皮质激素模型、单胺递质耗竭模型等; 其中, CUMS 模型可较好地模拟抑郁病症, 并用来探究各种病理、病因、分子机制等, 是目前抑郁症研究中应用较普遍的一种模型^[7]。但是上述模型的复制大部分是基于抑郁症表现行为学的改变或“单胺类递质”及“HPA 轴”假说, 随着基础研究的深入, 抑郁症的发病机制已拓展至“神经营养”假说, 且其或将成为国内外研究的热点, 因此开发一种基于该假说的新模型并在此基础上开展研究具有重要的价值。

行为学评价可以重现抑郁患者行为学的特征, 在某种程度上可以很好的评价模型的表征改变。快感缺失是抑郁症的核心症状, 主要是以糖水偏好的程度作为参考指标^[8]。自主、探究活动下降及紧张度增高是抑郁症的重要表征, 水迷宫法是一种关于场景和事件的学习记忆模式, 亦是一种空间辨别性学习记忆的经典检测方法^[9]。本文结果表明, 海马内微量注射 K252a 可模拟抑郁状态下的行为学改变, 表现在活动量、糖水消耗量、学习记忆能力显著下降, 故从表面效度而言与临床抑郁症患者表征的变化具有一致性。



与空白组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DMSO 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 CUMS 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 k252a 组比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

注: Control(空白对照组); CUMS model(慢性应激抑郁模型组); DMSO(假手术组即海马内微量注射二甲基亚砷); K252a(海马内微量注射 K252a); K252a + CUMS(海马内微量注射 K252a 联合慢性应激)

图 7 各组大鼠海马相关蛋白表达的

含量变化($n = 6, \bar{x} \pm s$)

(* $P < 0.05$, vs. the control group, ** $P < 0.01$, vs. the control group; # $P < 0.05$, vs. the DMSO group, ## $P < 0.01$, vs. the DMSO group; ▲ $P < 0.05$, vs. the CUMS group, ▲▲ $P < 0.01$, vs. the CUMS group; ■ $P < 0.05$, vs. the k252a group, ■■ $P < 0.01$, vs. the k252a group.)

Fig. 7 Protein levels in the rat hippocampus of each group.

“单胺递质假说”和“神经内分泌假说”是抑郁症发病机制研究的核心假说。患者体内突触间隙 5-HT、DA、NE 含量的降低可以导致抑郁症的发生,而抑郁症患者机体必然存在 5-HT、DA、NE 含量的耗竭^[10]。抑郁症患者血浆皮质醇分泌过多,且分泌的昼夜节律亦有变化,即抑郁症患者存在 HPA 轴功能障碍^[11]。本文结果表明,海马内微量注射 K252a 可导致大鼠血清 5-HT、DA、NE 含量下降,血浆 CRH、ACTH、CORT 含量升高,即 HPA 轴功能亢进。故从结构效度上而言与抑郁症患者情绪障碍的生理学基础,即神经生物学机制的变化相同。

抑郁症“神经营养”假说认为 BDNF 含量的降低会使神经元营养障碍,导致海马损伤,进而诱发抑郁症。BDNF 是该假说的核心,而 BDNF 主要是通过 Trk B 调节其下游胞内信号传导变化。神经元 BDNF/TrkB 信号的变化可导致抑郁症的发生^[12]。BDNF 通过激活 TrkB 和丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导级联影响细胞功能,其中 ERK1/2 是 MAPK 信号级联中重要的蛋白,海马内 ERK1/2 水平的降低参与抑郁症的发生^[13]。BDNF/TrkB 信号上游可受 CREB 的影响,下游可以调节海马神经元凋亡^[14]。CREB 可调节脑内多种基因的转录,参与神经元的兴奋、发育、凋亡以及突触可塑性等多个神经过

程^[15]。Bcl-2 是神经元凋亡的关键蛋白,其在大鼠海马细胞凋亡损伤过程中起着重要作用^[16]。本文结果表明,海马内微量注射 K252a 可导致模型大鼠海马 BDNF、CREB、ERK1/2、BCL-2 的表达降低,提示该模型海马神经元损伤,故从功能效度而言与抑郁症“神经营养障碍”的胞内信号转导机制及神经元损伤相符。

综上,海马内微量注射 K252a 可在行为、血液、分子生物学指标等方面模拟 CUMS 大鼠的变化,并可分别从表面效度、结构效度、功能效度等不同方面验证模型的可靠性,该模型的建立可为抑郁症的基础研究及抗抑郁药物的筛选和研制提供一个良好的技术平台。

参考文献:

[1] Wei M, Qin J, Yan R, et al. Abnormal dynamic community structure of the salience network in depression[J]. J Magn Reson Imaging, 2016, Version of Record online; doi: 10.1002/jmri.25429

[2] Wang HY, Zhang YQ, Qiao MQ. Mechanisms of extracellular signal-regulated kinase/cAMP response element-binding protein/brain-derived neurotrophic factor signal transduction pathway in depressive disorder[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(9): 843-852.

[3] Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein

(下转第 40 页)