

杨颖雯,周瑾,黄菲. 不同年龄段小鼠抑郁及焦虑样行为的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 248–253.

Yang YW, Zhou J, Huang F. Comparison of depression-like and anxiety-like behaviors in mice of different ages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 248–253.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.02.015

不同年龄段小鼠抑郁及焦虑样行为的比较

杨颖雯,周瑾,黄菲*

(上海中医药大学中药研究所, 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

【摘要】 目的 观察和比较不同年龄段实验小鼠的抑郁及焦虑样行为。**方法** 将 27 只雄性 C57BL/6 小鼠按年龄分为青年组(3 月龄, $n=9$)、中年组(10 月龄, $n=9$)、老年组(18 月龄, $n=9$), 分别进行悬尾测试、强迫游泳测试、高架十字迷宫测试、开放旷场测试和糖水偏好测试, 观察小鼠抑郁及焦虑样行为, 并用液质联用(LC-MS/MS)法检测 C57BL/6 小鼠血清 5-羟色胺含量。**结果** 中年组小鼠比老年组小鼠的悬尾不动时间长($P<0.05$); 青年组、中年组、老年组小鼠强迫游泳不动时间显著递减, 青年组小鼠游泳不动时间显著大于中年组小鼠($P<0.001$)和老年组小鼠($P<0.001$), 中年组小鼠游泳不动时间显著大于老年组小鼠($P<0.01$); 中年组小鼠比老年组小鼠 12 小时糖水偏好率高($P<0.05$), 青年组小鼠比老年组小鼠 12、36、48、60 小时糖水偏好率高($P<0.05$); 老年组小鼠比中年组和青年组小鼠开臂时间长($P<0.05$), 青年组小鼠比中年组小鼠探头次数多($P<0.01$); 青年组小鼠比老年组小鼠在旷场中的移动总距离长($P<0.05$); 老年组、中年组、青年组小鼠血清 5-HT 含量呈递减趋势, 青年组小鼠血清 5-HT 显著低于中年组($P<0.05$)和老年组($P<0.01$)。**结论** 整体而言, 同一刺激下, 小鼠的年龄越小, 越易表现出抑郁及焦虑样行为, 血清中 5-HT 水平越低。

【关键词】 年龄段; 抑郁样行为; 焦虑样行为; 5-羟色胺

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0248-06

Comparison of depression-like and anxiety-like behaviors in mice of different ages

YANG Yingwen, ZHOU Jin, HUANG Fei*

(Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Corresponding author: HUANG Fei. E-mail: Fei_H@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe and compare the depression-like and anxiety-like behaviors in mice of different ages. **Methods** Twenty-seven male C57BL/6 mice were divided into three groups according to age: young group (3 months, $n=9$), middle-aged group (10 months, $n=9$) and old group (18 months, $n=9$). The tail suspension test, forced swimming test, elevated plus maze test, open field test, and sugar preference test were used to detect depression-like and anxiety-like behaviors. Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry was used to detect 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels in the serum of mice. **Results** The immobility time of middle-aged mice was longer than that of old mice in tail suspension test($P<0.05$); the immobility time of forced swimming decreased from young to middle-aged mice ($P<$

[基金项目] 国家自然科学基金(81703734), 上海市青年科技英才扬帆计划(17YF1417700), 上海市自然科学基金(17ZR1430200), 上海市卫计委临床专项(20184Y0177), 上海中医药大学大学生创新创业项目。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81703734), Shanghai Sailing Program (17YF1417700), Natural Science Foundation of Shanghai (17ZR1430200), and Program from Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (20184Y0177), Innovation and Entrepreneurship Project for College Students of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine.

[作者简介] 杨颖雯(1997—)女, 本科在读, 研究方向: 精神药理。Email: hellokittytyw@163.com

[通信作者] 黄菲(1986—)女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中药精神药理。Email: Fei_H@hotmail.com

0.001) and from middle-aged to old mice ($P < 0.01$). The sucrose preference of middle-aged mice was higher than that of old mice at 12 hours ($P < 0.05$); the sugar preference rate of young mice was higher than that of old mice at 12, 36, 48, and 60 hours ($P < 0.05$). The time spent in the open arms by old mice was longer than that of middle-aged and young mice ($P < 0.05$) and the probe number of young mice was greater than that of middle-aged mice ($P < 0.01$). The total distance travelled in the open field by young mice was longer than that of old mice ($P < 0.05$). The concentration of 5-HT in the serum of old, middle-aged, and young mice showed a decreasing trend. The concentration of serum 5-HT in young mice was significantly lower than that in middle-aged ($P < 0.05$) and old mice ($P < 0.01$). **Conclusions** The younger the mice, the more likely they were to exhibit depression- and anxiety-like behaviors under the same stress stimulations, and to have a lower level of 5-HT in their serum.

[Keywords] age; depression-like behavior; anxiety-like behavior; 5-HT

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抑郁症是一种常见的精神疾病,可以影响思维、情绪和身体健康。它的特点是情绪低落、缺乏活力、悲伤、失眠和无法享受生活等^[1]。焦虑是当面对威胁或压力时产生的恐惧感,当面对危险时,这是一种正常的反应,但是,如果它是压倒性的或者这种感觉持续存在,它可以被视为焦虑症^[2]。同时出现焦虑和抑郁症状比单独出现的各种症状更为常见,超过三分之二的重度抑郁症患者也报告有焦虑症^[3]。研究表明,抑郁与人的年龄差异呈倒“U”型关系^[4],抑郁动物模型是研究抑郁症的重要工具,考察不同年龄的小鼠抑郁焦虑样行为有助于小鼠抑郁模型造模年龄的正确选择,故本实验重点研究抑郁焦虑样行为与小鼠年龄之间的关系。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine 5-HT)是一种多功能生物胺,在一系列生理途径的信号转导中起着重要的作用。我们体内的大部分 5-HT 都是在胃肠道粘膜内被称为肠嗜铬细胞的特殊的肠内分泌细胞中合成的,它们提供了我们所有的循环 5-HT^[5]。5-HT 主要分布在外围系统中,只有少量的 5-HT 位于中枢神经系统中,中枢系统中的 5-HT 是一种重要的神经递质和信号分子,可以调节情绪、睡眠、学习记忆等生理活动。本实验通过行为学和 5-HT 多层次验证不同年龄小鼠的抑郁焦虑样行为的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

根据文献^[6]选择不同年龄的清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 27 只,9 只 1 月龄,体重(20 ± 2)g;9 只 8 月龄,体重(32 ± 4)g;9 只 16 月龄,体重(37 ± 4)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司

【SCXK(沪)2017-0005】,饲养于上海中医药大学实验动物中心清洁级环境【SYXK(沪)2014-0008】,适应性饲养 2 月后进入实验。实验操作过程中符合上海中医药大学实验动物伦理要求(伦理审批号:SZY201707016)。

1.1.2 试剂及仪器

5-HT (Sigma, H9523), 乙腈 (Fisher Chemical, 173534), 甲醇 (Fisher Chemical, 138507), 甲酸 (Fisher Chemical, 172433)。

低温冷冻离心机 (5424R, 德国 Eppendorf 公司), 高通量组织研磨机 (TL-48E, 上海净信科技公司), 涡旋振荡仪 (MX-S, Dragonlab), 液相质谱联用仪 (DEBAF01206, 安捷伦), 色谱柱 (C18-BEH, 美国 Waters 公司), 全自动氮吹浓缩仪 (5T250, 美国 Biotage 公司), 悬尾、强迫游泳、开放旷场及高架十字迷宫测试仪 (上海移数信息科技有限公司), 行为学分析软件 (EthoVision XT, 荷兰 Noldus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 悬尾测试 (tail suspension test, TST)

将小鼠倒挂并用胶带将尾部黏在在水平杆上,小鼠头部与地面保持 7 ~ 8 cm 的距离,记录每只小鼠在 6 min 中的后 4 min 里的累积不动时间。

1.2.2 强迫游泳测试 (forced swimming test, FST)

将小鼠置于装有 18 cm 深清水的透明柱型容器内 (高 30 cm, 直径 20 cm), 并将水温保持在 (25 ± 1) °C, 记录每只小鼠在 6 min 中的后 4 min 里的累积不动时间。

1.2.3 高架十字迷宫测试 (elevated plus maze test, EPMT)

将小鼠放在十字迷宫的中间,头面向开臂开始实验,记录 5 min 内小鼠进入开臂的时间,另记录小鼠的探头次数。每只小鼠测试之后用 75% 的酒精

清洁仪器,并保持实验过程安静且光线均匀。

1.2.4 旷场测试(open field test,OFT)

将小鼠放入实验箱(长 60 cm,宽 60 cm,高 60 cm)中行为学分析软件记录 5 min 内小鼠的活动总路程。每只小鼠测试之后用 75%的酒精清洁仪器,并保持实验过程安静且光线均匀。

1.2.5 糖水偏好测试(sugar preference test,SPT)

测试之前,给每笼小鼠糖水和纯水各一瓶适应 1 d,糖水适应结束后,同时给每笼小鼠糖水和纯水各一瓶,测试 60 h,测试过程中每 12 h 交换 1 次水瓶位置,记录糖水和纯水消耗量,计算糖水偏好率。糖水偏好率等于糖水的消耗量除以糖水和纯水的总消耗量。

1.2.6 LC-MS/MS 法检测 C57 小鼠血清 5-羟色胺的含量

血清从-80℃的冰箱取出后放于冰上解冻,完全解冻后吸取 100 μL 转移至新 EP 管中,每份样品各加入 400 μL 的含 0.1% 甲酸的冰甲醇,涡旋 1 min,4℃ 15 000 r/min 离心 15 min;取上清液,用氮气挥干,每份样品再加 100 μL 流动相复溶,涡旋混匀,再次 4℃ 15000 rpm 离心 15 min,取 80 μL 上清液至液相小瓶中待分析。液相条件:用 0.1% 甲酸-水、乙腈作为流动相进行梯度洗脱,梯度洗脱程序:0 ~ 4 min 2% 乙腈;6 min 80% 乙腈;8 ~ 10 min 90% 乙腈;柱温:30℃;流速 0.1 mL/min;进样量:10 μL;自动进样器温度:4℃。LC-MS/MS 色谱条件参考本实验室已发表文献^[7]。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7 软件对实验数据进行分析,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示数据,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多组间差异分析,F 值显著后两两之间的比较方法为 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑郁样行为

2.1.1 悬尾测试

中年组小鼠的不动时间比老年组小鼠的不动时间长,差异具有显著性($P < 0.05$)。青年组小鼠的不动时间略短于中年组小鼠的不动时间,但长于老年组小鼠的不动时间,见图 1($F(2,24) = 4.897$)。

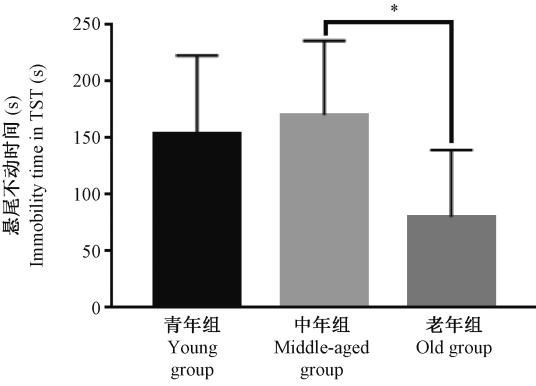
2.1.2 强迫游泳测试

青年组小鼠强迫游泳不动时间显著长于中年

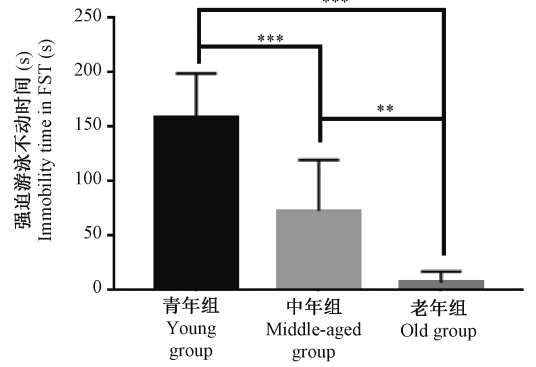
组($P < 0.001$)和老年组小鼠($P < 0.001$);中年组小鼠强迫游泳不动时间亦显著长于老年组小鼠($P < 0.01$),见图 2($F(2,24) = 38.950$)。

2.1.3 糖水偏好测试

老年组小鼠 12 h 糖水偏好率显著低于青年组($P < 0.05$)和中年组小鼠($P < 0.05$),见图 3A($F(2,23) = 4.909$);青年组小鼠 36 h 糖水偏好率显著高于老年组小鼠($P < 0.05$),见图 3B($F(2,23) = 4.703$);青年组小鼠 48 h 糖水偏好率亦显著高于老年组小鼠($P < 0.05$),见图 3C($F(2,23) = 5.017$);青年组小鼠 60 h 糖水偏好率仍显著高于老年组小鼠($P < 0.05$),见图 3D($F(2,23) = 4.450$)。



注:中年组与老年组相比,* $P < 0.05$ 。
图 1 悬尾不动时间
Note. Middle-aged group compared with old group,* $P < 0.05$.



注:青年组与中年组相比,*** $P < 0.001$ 。青年组与老年组相比,*** $P < 0.001$ 。中年组与老年组相比,** $P < 0.01$ 。
图 2 强迫游泳不动时间
Note. Young group compared with middle-aged group,*** $P < 0.001$. Young group compared with old group,*** $P < 0.001$. Middle-aged group compared with old group,** $P < 0.01$.

Figure 2 Immobility time in FST

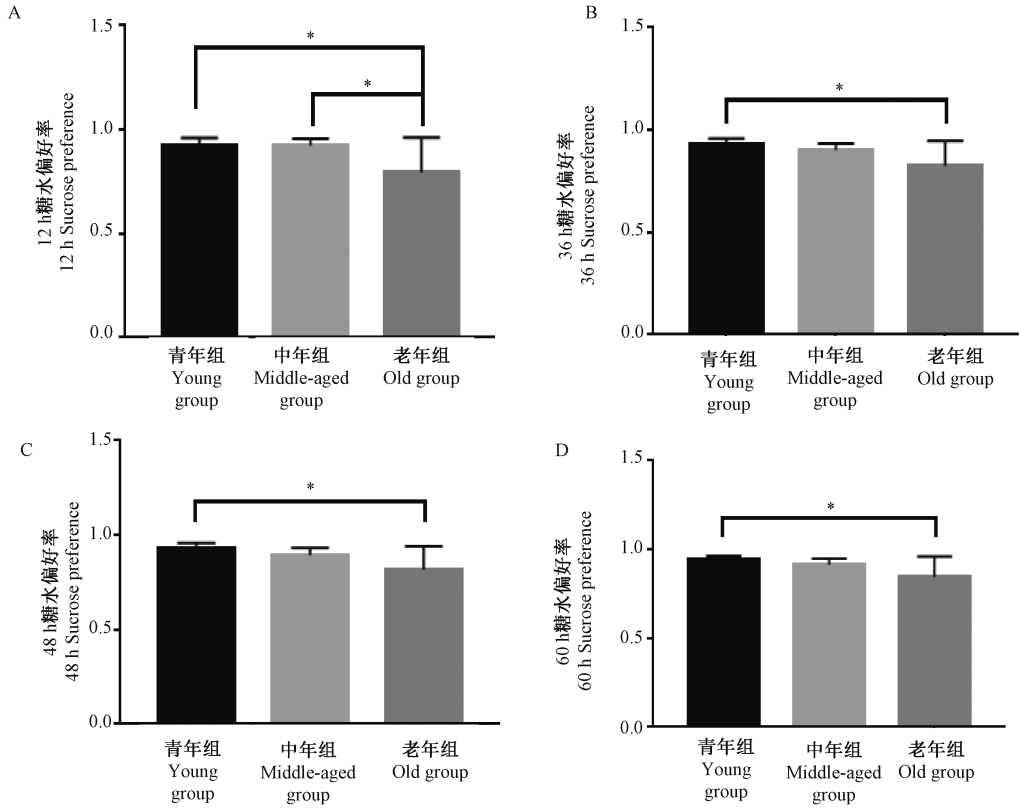
2.2 焦虑样行为

2.2.1 高架迷宫测试

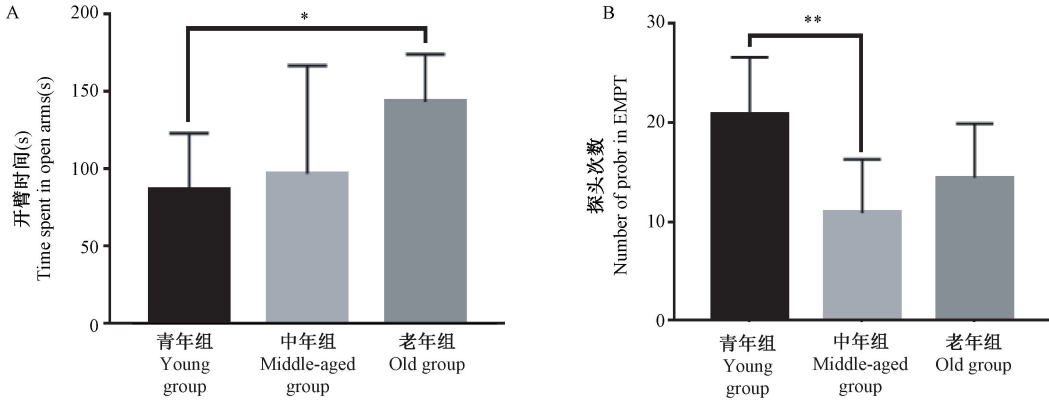
老年组小鼠开臂时间显著长于青年组 ($P < 0.05$), 见图 4A ($F(2, 22) = 3.738$); 青年组小鼠探头次数显著多于中年组小鼠 ($P = 0.01$), 见图 4B ($F(2, 24) = 7.460$)。

2.3 自主活动(开放旷场测试)

青年组小鼠在旷场中的移动总距离显著大于老年组小鼠 ($P < 0.05$), 见图 5 ($F(2, 24) = 3.628$)。



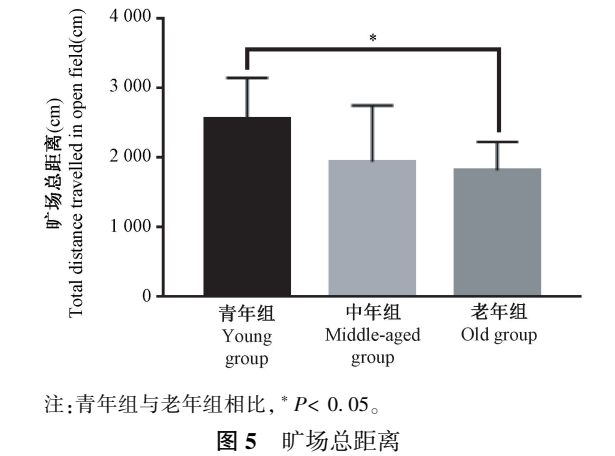
注: 青年组与老年组相比, $* P < 0.05$ 。中年组与老年组相比, $* P < 0.05$ 。
Figure 3 Sucrose preference
Note. Young group compared with old group, $* P < 0.05$. Middle-aged group compared with old group, $* P < 0.05$.



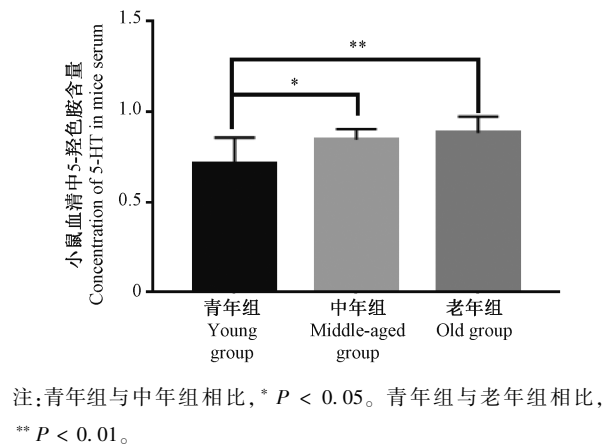
注: 青年组与老年组相比, $* P < 0.05$ 。青年组与中年组相比, $** P < 0.01$ 。
Figure 4 Elevated plus maze test
Note. Young group compared with old group, $* P < 0.05$. Young group compared with middle-aged group, $** P < 0.01$.

2.4 LC-MS/MS 法检测 C57BL/6 小鼠血清 5-羟色胺含量

如图 6(F(2,24)= 6.730)所示,青年组、中年组和老年组小鼠血清 5-羟色胺含量依次呈递增趋势,青年组小鼠血清 5-羟色胺含量显著低于中年组小鼠($P < 0.05$)和老年组小鼠($P < 0.01$)。



Note. Young group compared with old group, * $P < 0.05$.
Figure 5 Total distance travelled in open field



Note. Young group compared with middle-aged group, * $P < 0.05$.
Young group compared with old group, ** $P < 0.01$.
Figure 6 Concentration of 5-HT in mice serum

3 讨论

抑郁症和焦虑症是常见的精神疾病,抑郁症更是预计在未来将会发展为继冠心病后的第二大疾病^[8]。多种行为学方法被用来评价动物的抑郁及焦虑样行为,本研究选用了常见的悬尾、强迫游泳、糖水偏好、高架十字迷宫和开放旷场测试来评价不同年龄小鼠的抑郁及焦虑样行为。

悬尾测试是用来评价小鼠抑郁行为的实验,当

小鼠被挂在水平杆上,一开始会处于本能激烈地挣扎试图逃离困境,但若不能脱困,会陷入绝望状态静止不动,表现出抑郁样行为^[9]。本研究中,中年组小鼠不动时间与青年组小鼠接近,明显高于老年组小鼠故提示,青年组小鼠与中年组小鼠比老年组小鼠在悬尾的同一刺激下更易表现出抑郁样行为。强迫游泳测试亦广泛用于评价小鼠抑郁样行为,与悬尾类似的,以不动时间评价抑郁行为状态。本结果提示,在强迫游泳的刺激下,年龄越小越容易表现出抑郁样的行为。糖水偏好测试亦用来测试小鼠抑郁行为,小鼠越不嗜糖,越易出现快感缺失的抑郁状态^[10]。在本研究中,各年龄小鼠 12、26、48、60 h 糖水偏好率整体差距不大,青年组略高于中年组,中年组略高于老年组。高架迷宫测试可以用来评价焦虑样行为,基于动物既想探索新环境又恐惧开放臂的矛盾状态^[11],小鼠进入开臂时间越短越焦虑^[12]。本研究中,老年组、中年组、青年组小鼠的焦虑程度呈递增趋势,结果提示,在高架迷宫中,年龄越小越容易表现出焦虑样的行为。开放旷场测试也是用来评价焦虑样行为的,用来考察小鼠自主活动和探究行为^[13],测试过程中小鼠在旷场中活动的总距离越长,则小鼠自主活动越多^[14]。本研究结果显示,青年组的自主活动最多,这与青年组小鼠在高架十字迷宫中探头次数增多一致,同时也排除了因自主活动的不同所造成的抑郁或焦虑样行为测试结果的偏差。

5-羟色胺是一种单胺类神经递质,研究表明,抑郁症患者大多会出现 5-HT 含量下降的情况^[15],李玉波等^[16]研究发现抑郁症肝郁脾虚证大鼠模型的海马内 5-HT 含量降低,李培育等^[17]研究发现血清 5-HT 浓度的增加可治疗焦虑性失眠,缓解焦虑情绪。在本实验中,青年组、中年组、老年组血清 5-HT 浓度依次增加,故在同样的刺激下,出现抑郁焦虑样行为也依次减少,与行为学结果一致。

本研究通过对不同年龄段小鼠抑郁焦虑样行为的比较发现,整体而言,同一刺激下,小鼠的年龄越小,越易表现出抑郁及焦虑样行为,并且还比较了三组小鼠血清中 5-HT 的含量,发现青年组小鼠较中年组小鼠以及老年组小鼠血清 5-HT 水平更低,其中的分子机制还需进一步研究。该结果将有助于选择合适年龄的实验小鼠用于抗抑郁及抗焦虑药物的药效学评价。

参 考 文 献 (References)

[1] Cui R. A systematic review of depression [J]. Curr

- Neuropharmacol, 2015, 13 (4): 480.
- [2] Dean E. Anxiety [J]. Nurs Stand, 2016, 30(46): 15.
- [3] Horwitz AV. How an age of anxiety became an age of depression [J]. Milbank Q, 2010, 88(1): 112-138.
- [4] Jorm AF. Sex and age differences in depression: a quantitative synthesis of published research [J]. Aust N Z J Psychiatry, 1987, 21(1): 46-53.
- [5] Martin AM, Young RL, Leong L, et al. The diverse metabolic roles of peripheral serotonin [J]. Endocrinology, 2017; 158 (5): 1049-1063.
- [6] The Jackson Laboratory. Lifespan as a biomarker[EB/OL]. [2020-03-11]. <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>.
- [7] Huang F, Li J, Shi HL, et al. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC-MS/MS [J]. J Neurosci Methods, 2014, 229: 8-14.
- [8] 成杰, 余洋, 孙晓明, 等. 不同剂量乙醇对小鼠抑郁和焦虑行为的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2019, 54(1): 55-58.
- Cheng J, Yu Y, Sun XM, et al. Effects of different doses of alcohol on depression and anxiety in mice [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 2019, 54(1): 55-58.
- [9] 丁蕊. 5-HT 神经元中 AdipoR1 对小鼠抑郁、焦虑样行为调控的研究[D]. 滨州: 滨州医学院, 2017.
- Ding R. AdipoR1 in 5-HT neurons regulates depression and anxiety-like behavior in mice [D]. Binzhou: Binzhou Medical College, 2017.
- [10] 梁敏. 苏合香精油吸嗅对应激致小鼠抑郁焦虑行为的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- Liang M. Effects of Suhe essential oil sniffing on stress-induced depression and anxiety in mice [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2018.
- [11] 兰芳. 硫化氢抑制神经炎症拮抗睡眠剥夺所致大鼠抑郁和焦虑行为[D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- Lan F. Hydrogen sulfide inhibits neuroinflammation and antagonizes depression and anxiety induced by sleep deprivation in rats [D]. Hengyang: University of South China, 2016.
- [12] Cui Y, Rong CL, Wang JM, et al. Mechanism-based anti-anxiety effects of polysaccharides extracted from Shudihuang (Radix Rehmanniae Preparata) by two-dimensional electrophoresis analysis in rat hippocampus proteins [J]. J Trad Chin Med, 2013, 33(4): 524-530.
- [13] 严文霞, 徐卫红, 陈旭, 等. 环境浓度壬基酚暴露对大鼠焦虑行为及其海马组织形态的影响 [J]. 重庆医学, 2019, 48 (3): 382-385.
- Yan WX, Xu WH, Chen X, et al. Effects of environmental exposure to nonylphenol on anxiety behavior and hippocampal morphology in rats [J]. Chongqing Med Coll, 2019, 48 (3): 382-385.
- [14] Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [J]. J Vis Exp, 2015, 6(96): e52434.
- [15] 潘中英, 赵婧, 陈静珊. 柴胡疏肝散联合帕罗西汀对抑郁症患者血清 5-HT 的影响及其安全性分析 [J]. 中医药信息, 2018, 35(1): 54-57.
- Pan ZY, Zhao J, Chen JS. Effect of Chaihu Shugan San combined with paroxetine on serum 5-HT in patients with depression and its safety analysis [J]. Inform Trad Chin Med, 2018, 35(1): 54-57.
- [16] 李玉波, 马雪玲, 武志黔, 等. 抑郁症肝郁脾虚证大鼠中枢及外周 5-羟色胺的变化规律研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1267-1271.
- Li YB, Ma XL, Wu ZQ, et al. Changes of 5-hydroxytryptamine in central and peripheral regions of rats with depression of liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Trad Chin Med Phaim, 2013, 28 (5): 1267-1271.
- [17] 李培育, 关雪莲. 酸枣仁汤联合穴位贴敷治疗焦虑性失眠的疗效及其对患者血清 5-HT、DA 的影响 [J]. 微量元素与健康研究, 2018, 35(6): 34-35+37.
- Li PY, Guan XL. Suanzaoren Decoction combined with Acupoint Application in the treatment of anxiety insomnia and its effect on serum 5-HT and DA [J]. Stud Trace Elem Health, 2018, 35 (6): 34-35+37.

[收稿日期] 2019-09-10