

沈皓天,姜俊杰,晁滢,等. 绝经后脂质代谢紊乱诱导小鼠抑郁症状的形成 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 733-742.
Shen HT, Jiang JJ, Chao Y, et al. Postmenopausal lipid metabolism disorder induces depressive symptoms in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 733-742.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.06.005

绝经后脂质代谢紊乱诱导小鼠抑郁症状的形成

沈皓天¹,姜俊杰¹,晁滢²,洪敏²,郑劼^{1,2*},卞慧敏^{2*}

(1. 南京中医药大学医学院·整合医学院,南京 210023;
2. 南京中医药大学药学院 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室,南京 210023)

【摘要】 目的 初步探讨绝经后脂质代谢紊乱是否参与抑郁症状的形成。**方法** 24 只 LDLR^{-/-} 和 16 只 WT C57BL/6J 雌鼠,分为 5 组($n = 8$),分别为:WT + 普通饮食组(WT)、WT + 高脂饮食组(WT-H)、LDLR^{-/-}去卵巢 + 普通饮食组(LDLR^{-/-})、LDLR^{-/-}去卵巢 + 高脂饮食组(LDLR^{-/-}-H)、LDLR^{-/-}去卵巢 + 高脂饮食 + 辛伐他汀组(XF),连续喂养 3 个月。LDLR^{-/-}雌鼠双侧卵巢摘除联合高脂饮食建立绝经后脂质代谢紊乱模型。检测小鼠体重、脑总胆固醇(TC)及海马 ER α 、ER β 水平、抑郁行为、脑内 5-HT 水平;对脑 TC 水平和抑郁相关指标进行相关性分析。**结果** (1)LDLR^{-/-}-H 组可复制绝经后脂质代谢紊乱特征,表现为小鼠体重显著增加、脑 TC 水平显著升高、海马 ER β 表达明显下降;(2)LDLR^{-/-}-H 组小鼠水平和垂直运动均显著降低,TST 静止时间显著增加,脑 5-HT 水平显著降低;(3)XF 组小鼠脑 TC 水平显著下降、抑郁行为明显改善,5-HT 水平明显提高;(4)小鼠脑 TC 水平与 5-HT 水平及抑郁样行为显著相关。**结论** 绝经后脂质代谢紊乱能诱导抑郁症状发生,通过调节脂质代谢可以显著改善抑郁症状。

【关键词】 LDLR^{-/-}小鼠;绝经后脂质代谢紊乱模型;抑郁症状;相关性分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 06-0733-10

Postmenopausal lipid metabolism disorder induces depressive symptoms in mice

SHEN Haotian¹, JIANG Junjie¹, CHAO Ying², HONG Min², ZHENG Jie^{1,2*}, BIAN Huimin^{2*}

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China. 2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

Corresponding author: ZHENG Jie. E-mail: jessiezhang@njucm.edu.cn; BIAN Huimin. E-mail: 320561@njucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate whether postmenopausal lipid metabolism disorder is involved in the development of depressive symptoms. **Methods** Twenty-four LDLR^{-/-} and sixteen WT C57BL/6J female mice were divided into five groups ($n = 8$): WT + normal diet group(WT), WT + high-fat diet group(WT-H), ovariectomized LDLR^{-/-} + normal diet group(LDLR^{-/-}), ovariectomized LDLR^{-/-} + high-fat diet group(LDLR^{-/-}-H), and ovariectomized LDLR^{-/-} + high-fat diet + simvastatin group(XF). Mice were fed continuously for 3 months. The postmenopausal lipid metabolism disorder model was established in LDLR^{-/-} female mice after bilateral ovariectomy combined with a high-fat diet. Body weight, total cholesterol (TC), ER α , and ER β levels in the hippocampus, depressive behavior, and 5-HT levels in the

[基金项目] 国家自然科学基金(81774029,81703733,82274168)。
Funded by National Nature Science Foundation of China(81774029,81703733,82274168)。
[作者简介] 沈皓天(2001—),男,在读本科生,研究方向:抗炎免疫与神经免疫药理。Email:shen_haotian@163.com
[通信作者] 郑劼(1984—),女,讲师,博士,研究方向:抗炎免疫与神经免疫药理。Email:jessiezhang@njucm.edu.cn;
卞慧敏(1958—),女,研究员,硕士,研究方向:心血管药理。Email:320561@njucm.edu.cn。
* 共同通信作者

brain were determined. The correlation between the brain TC level and depression-related indexes was analyzed. **Results** (1) The LDLR^{-/-}-H group successfully replicated the characteristics of postmenopausal lipid metabolism disorder, which showed a significant increase in body weight, a notable increase in the brain TC level, and a significant decrease in expression of ER β in the hippocampus. (2) Horizontal and vertical locomotor activities of the LDLR^{-/-}-H group were significantly decreased, the immobilized time of TST was significantly increased, and the brain 5-HT level was significantly decreased. (3) The brain TC level of the XF group was significantly decreased, depressive behavior was significantly improved, and the 5-HT level was significantly increased. (4) Correlation analysis showed that the TC level in the brain was significantly correlated to the 5-HT level and depression-like behaviors. **Conclusions** Postmenopausal lipid metabolism disorder induces depressive symptoms, and depression symptoms can be significantly improved by regulating lipid metabolism disorder.

[Keywords] LDLR^{-/-} mice; postmenopausal lipid metabolism disorder; depressive symptoms; correlation analysis

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

抑郁症是极其常见的一种心理疾病,以连续且长期的心情低落为主要临床特征。目前,抑郁症已成为一个严重的社会和医学问题。据世界卫生组织统计,抑郁症已成为世界第四大疾病,有超过 3.5 亿人受其困扰,且抑郁症患病率还在快速增长中^[1]。抑郁症的发病受环境、生理、心理多方面影响,涉及神经递质、免疫及内分泌系统紊乱等多种因素,但其具体病理形成机制目前尚未被完全阐释。值得关注的是,抑郁症状在绝经期女性中更为常见。流行病学研究表明,在性激素水平发生异常变化的重要时期,如绝经期,女性会出现更多的抑郁症状^[2-3]。荟萃分析显示,中国女性绝经期抑郁症患病率高达 36.3%^[4]。在希腊有超过四分之一的绝经后女性抑郁症筛查为阳性^[5]。这些临床数据表明雌激素水平的改变可能是抑郁症状发生的重要风险因素。

近年来越来越多的研究关注到代谢失调可能与情绪障碍存在相关性,特别是脂质代谢异常可能与抑郁症状发生相关^[6-7]。研究发现抑郁患者或抑郁模型中存在包括脂肪酸、瘦素等脂质代谢异常^[8-9],而脂质代谢紊乱所导致的一系列生理病理的变化中包括产生抑郁样症状的现象,提示脂质代谢紊乱可能参与抑郁症状形成^[10-12]。值得注意的是,多项研究指出绝经后女性雌激素水平减少能够引起机体能量代谢和脂质代谢异常,严重的情况下甚至会引发代谢综合征^[13-14]。荟萃分析显示绝经后女性的抑郁状态与血浆脂质代谢水平密切相关^[15]。也有研究指出绝经后女性脂联素和瘦素水平与其抑郁和焦虑症状显著相关,较高的脂联素和较低的瘦素水平可作为绝经后女性抑郁症状的潜在标注物^[16]。因此,绝经后脂质代谢紊乱可能与抑郁症状高发密切相关,调节脂质代谢可能是防治绝

经后女性抑郁症状的途径之一。

LDLR 受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 敲除小鼠 (LDLR^{-/-}) 是目前在动脉粥样硬化研究领域应用最多的基因工程小鼠之一,该小鼠对脂肪和胆固醇都非常敏感,给予其高脂饮食可诱导脂质代谢异常^[17-18]。本研究利用 LDLR^{-/-}小鼠双侧卵巢摘除联合给予高脂饲料长期喂养拟建立绝经后女性脂质代谢紊乱模型,对绝经后脂质代谢紊乱是否能诱导抑郁症状的形成进行初步探索。该研究结果可为深入理解抑郁症状的发生机制及寻找基于调控脂质代谢改善绝经期女性抑郁症状药物的开发提供依据与思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 16 只和 LDLR^{-/-} (C57BL/6J 背景) 小鼠 24 只,雌性,6 ~ 8 周龄,体重 15 ~ 20 g;购自江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。所有动物饲养于南京中医药大学实验动物中心【SYXK(苏)2018-0049】。将每组小鼠($n = 8$)置于 1 个饲养笼内,适应性饲养 7 d。饲养环境通风良好,恒温 22 $\pm$ 2℃、避光,相对湿度 40% ~ 55%,采用 12 h 的明暗周期(8:00 ~ 20:00),给予充足的食物与水。所有实验动物的操作及饲养均符合南京中医药大学实验动物管理饲养条例(201905A036)。

1.1.2 主要试剂与仪器

高脂饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司(胆固醇 0.15%,蔗糖 34%,脂肪 21%),辛伐他汀胶囊购自扬子江药业集团四川海蓉药业有限公司(批号:1870401),小鼠 5-羟色胺(5-HT)酶联免疫

试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:20191211),总胆固醇检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:20191118),ER α 抗体购自 Abcam 公司(货号:ab32063),ER β 抗体购自 Abclone 公司(货号:A2546)。

自制旷场实验敞箱,尺寸 90 cm $\times$ 90 cm $\times$ 90 cm,四周和底部均涂成黑色,底部用白线分成 25 个正方格(18 cm $\times$ 18 cm),SyneRgy2 酶标仪(BioTek 公司,型号:XSZ-02),高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司),5417R 台式微量冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),电子天平(DENVER 仪器公司,型号:SI-403,型号:GB1203),Nanodrop1000 分光光度计(ThermoFisher,型号:M0530S),Leica 光学显微镜(Leica,型号:S40/0.45)。

1.2 方法

1.2.1 脂质代谢紊乱造模及给药

将雌性 LDLR $^{-/-}$ 小鼠 24 只和野生型小鼠(C57BL/6J)16 只,分别按照体重分层随机分组分为 5 组($n = 8$),分别为:WT + 正常饮食组(WT)、WT + 高脂饮食组(WT-H)、LDLR $^{-/-}$ 去卵巢 + 正常饮食组(LDLR $^{-/-}$)、LDLR $^{-/-}$ 去卵巢 + 高脂饮食组(LDLR $^{-/-}$ -H)、LDLR $^{-/-}$ 去卵巢 + 高脂饮食 + 辛伐他汀组(XF)。其中,LDLR $^{-/-}$ 去卵巢小鼠均通过阴道涂片确定为无动情周期:选用雌性 LDLR $^{-/-}$ 小鼠,腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠麻醉,沿背部两侧开一小口,进行双侧卵巢摘除手术。手术完成 1 周后,连续 1 周对小鼠进行阴道涂片,显微镜下观察小鼠是否还存在动情周期,无动情周期表明小鼠卵巢完全摘除,绝经模型复制成功。XF 给药:小鼠适应性饲养 1 周后,灌胃给药 XF,0.45 mg/kg,0.1 mL/10 g,连续给药 3 个月。WT-H 组、LDLR $^{-/-}$ -H 组和 XF 组均给予高脂饲料喂养连续 3 个月。小鼠全程给予普通饮用水,自由饮用。

1.2.2 抑郁行为学评价

(1)旷场实验:旷场实验(open field test, OFT)参照已发表文献进行实验操作^[19]。在测试期间,保持房间黑暗及安静。每只小鼠先置于敞箱中心格内,敞箱底部用白线分成 25 个正方格(18 cm $\times$ 18 cm),随后计时,观察并记录小鼠 4 min 内的行为,包括:水平运动次数(小鼠从一个格子移动到另一个格子,四肢完全脱离一个格子并进入另一个格子)和垂直运动次数(小鼠垂直站立,两前肢完全抬起)。

(2)尾悬实验:尾悬实验(tail suspension test,

TST)参照已发表的文献进行实验操作^[20]。将小鼠尾端用胶带固定在固定架上,胶带距小鼠尾部约 1 ~ 2 cm 处,使小鼠头部向下悬挂,离地面约 20 cm,记录下在这种环境下,小鼠因绝望而静止的累积时间。每只小鼠悬吊 6 min,适应 2 min,记录后 4 min 累积静止不动的时间。

1.2.3 生化指标

(1)脑组织匀浆上清的收集:小鼠在实验周期结束后经眼眶取血,将外周血储存在 1.5 mL EP 管中,3500 r/min 离心 10 min,吸取上清,分装后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。小鼠经戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后脊脑分离处死取脑,剔除小鼠头盖骨,取出完整脑组织,并将脑组织装入 EP 管中,进行称重。以 1:10 进行脑组织研磨,加入 9 倍体积的生理盐水。在 EP 管中加入 2 个直径 3 mm 的研磨珠,用匀浆机进行研磨 50 Hz 30 s。研磨完毕后,4 $^{\circ}$ C,3500 r/min 离心 10 min,取上清 300 μ L,分装后,储存在 -80 $^{\circ}$ C,待用。

(2)脑匀浆总胆固醇检测:脑匀浆上清样本于 -80 $^{\circ}$ C 取出,在室温下解冻、混匀、快速离心。参照总胆固醇(T-CHO)试剂盒的说明书进行样本处理及检测。在波长 510 nm 处,用酶标仪测定每孔吸光度(OD)。根据说明书中提供的计算公式,计算出总胆固醇含量。

(3)免疫组化染色脑组织雌激素受体:小鼠脑组织经固定、包埋、切片制作完成后脱蜡及水化,使用 3% 过氧化氢去除过氧化氢酶,使用 PBS 洗 3 遍,然后使用柠檬酸盐缓冲液 95 $^{\circ}$ C 煮 20 min 进行抗原修复,冷却后将载玻片平铺在保湿盒中,滴加 0.2% 曲拉通进行通透,通透后使用 5% BSA 封闭 20 min,配置一抗(ER α 、ER β)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第 2 天取出切片室温放置 45 min 复温后,PBS 洗 3 次后孵育二抗 2 h,二抗孵育结束后使用 PBS 清洗 3 次,使用 DAB 显色液显色,显色结束后使用苏木素染核,1% 盐酸乙醇分化,自来水冲洗 15 min 反蓝,再经过脱水,二甲苯透明和封片后,显微镜拍照观察。每组选取 3 只小鼠进行脑组织包埋、切片,每只小鼠观察 3 张切片,每张切片观察 3 个视野。通过 ImagePro Plus 图像分析软件进行半定量分析,即软件识别每只小鼠的累积光密度(IOD)以及每个视野下的有效目标分布区域面积(area)。计算每只动物样本的平均光密度(mean density = IOD/Area)并进一步进行统计分析。

(4) 脑匀浆 5-HT 水平检测: 参照 5-HT ELISA 检测试剂盒说明对小鼠脑匀浆上清中 5-HT 水平进行检测。使用酶标仪(波长 450 nm 和 560 nm)读取各 OD 值(10 min 内完成), 根据标准曲线计算样本含 5-HT 水平。

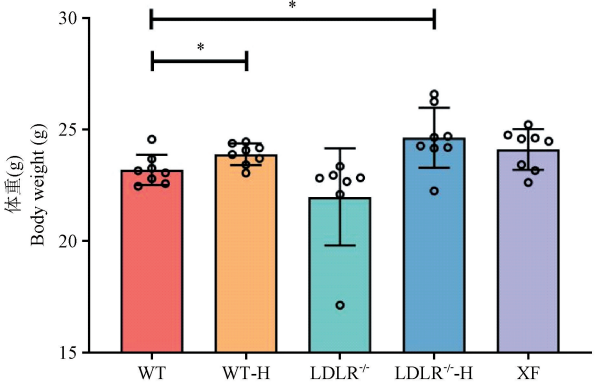
1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.3 软件进行数据统计处理, 所有结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用非配对 *t*-test 进行两组间检验; 采用 One-way ANOVA 进行多组间检验; 采用相关性分析比较两因素相关性, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠体重的影响

各组小鼠在 3 个月实验周期的最后 1 d 称量体重。结果如图 1 所示, 与 WT 组相比, WT-H 组及 LDLR^{-/-}-H 组小鼠体重显著性增加($P < 0.05$), LDLR^{-/-}组小鼠体重有下降趋势但无统计学意义; 与 LDLR^{-/-}-H 组相比, 给予 XF 后小鼠体重有下降趋势, 但未见显著性差异。该结果表明 LDLR^{-/-}小鼠经双侧卵巢摘除并给予长期高脂喂养建立绝经后脂质代谢紊乱模型小鼠的体重显著增加, 但 XF 给药未见对小鼠体重有显著影响。



注: 与 WT 组相比, * $P < 0.05$ 。(下同)

图 1 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

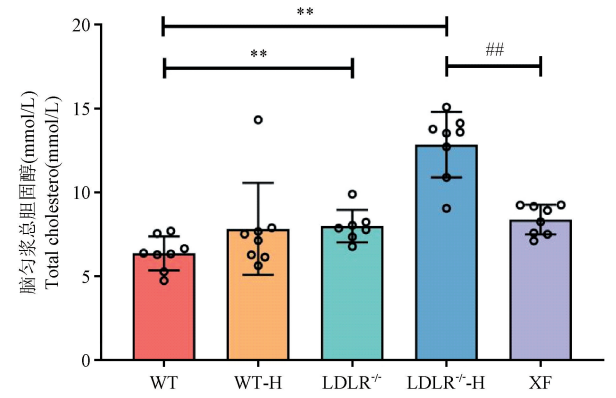
Note. Compared with WT group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of postmenopausal lipid metabolism disorder on body weight of mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.2 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠脑匀浆总胆固醇含量的影响

各组小鼠在实验周期结束后检测脑中总胆固醇含量。结果如图 2 所示: 与 WT 组相比, WT-H 组

小鼠脑中总胆固醇水平没有显著变化, 而 LDLR^{-/-}组及 LDLR^{-/-}-H 组小鼠脑中总胆固醇水平均显著升高($P < 0.01$); 与 LDLR^{-/-}-H 组相比, XF 组小鼠脑中总胆固醇水平显著降低($P < 0.01$)。该结果表明绝经后脂质代谢紊乱模型小鼠脑中总胆固醇水平的显著升高, 提示该模型存在中枢脂代谢异常, 辛伐他汀给药能显著降低小鼠脑中总胆固醇水平。



注: 与 WT 组相比, ** $P < 0.01$; 与 LDLR^{-/-}-H 组相比, ## $P < 0.01$ 。(下同)

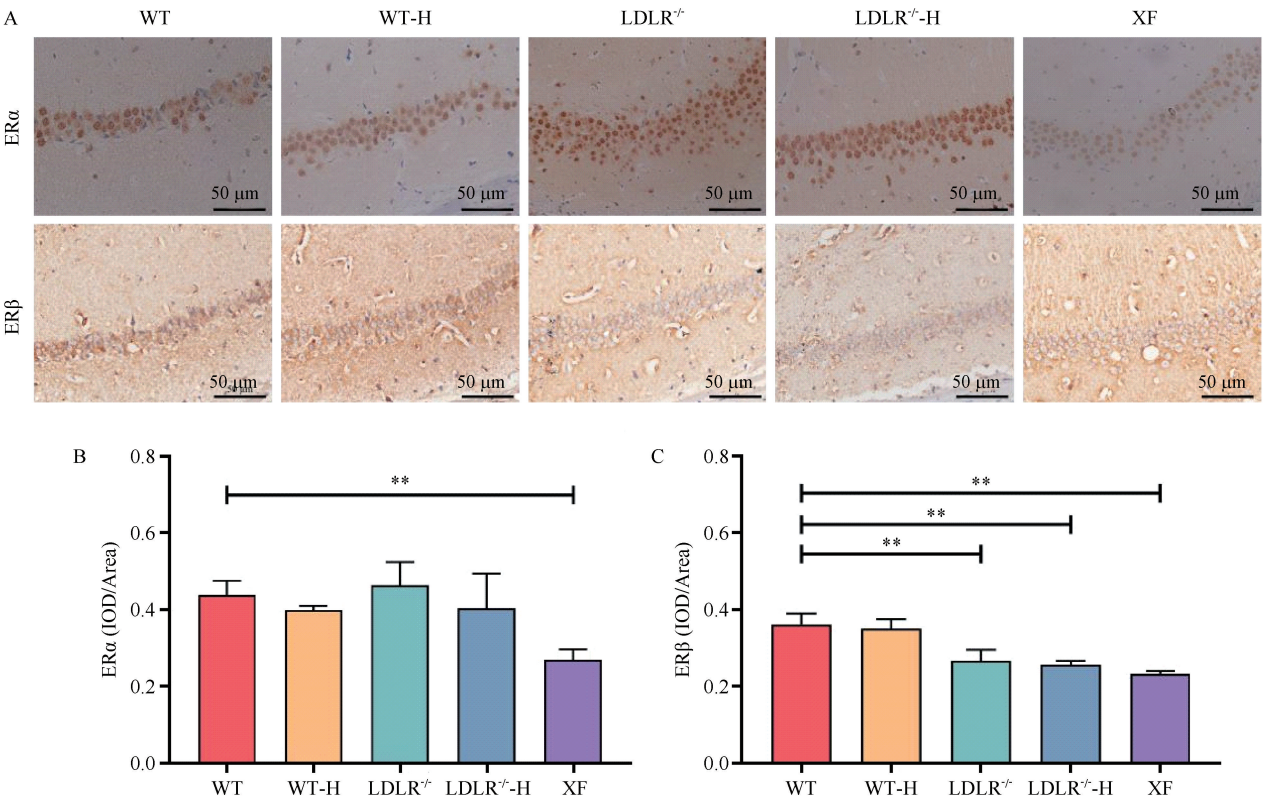
图 2 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠脑匀浆总胆固醇含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared with WT group, ** $P < 0.01$. Compared with LDLR^{-/-}-H group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Effect of postmenopausal lipid metabolism disturbance on total cholesterol level in mice brain homogenates($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.3 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠海马雌激素受体表达的影响

绝经后脂质代谢紊乱造模及给药后, 利用免疫组化染色检测各组小鼠海马中雌激素受体 ER α 和 ER β 的表达情况。结果如图 3 所示: 与 WT 组相比, LDLR^{-/-}组和 LDLR^{-/-}-H 组小鼠海马中 ER α 的表达水平未见明显变化; 但 XF 干预后与 WT 组相比, 海马中 ER α 的表达显著下降。与 WT 组相比, LDLR^{-/-}组和 LDLR^{-/-}-H 组小鼠海马中 ER β 的水平显著下降; XF 干预对 LDLR^{-/-}组和 LDLR^{-/-}-H 组海马 ER β 的表达无显著影响, 与 WT 组相比仍是显著降低。该结果表明绝经后脂质代谢紊乱模型小鼠海马区存在雌激素受体 ER α 和 ER β 表达变化的不同。其中该模型对 ER α 的表达无明显影响, 但 XF 干预会引起海马 ER α 的表达水平下降; 更重要的是该模型会引起海马组织 ER β 的表达水平下降, XF 干预对 ER β 的表达无明显作用。



注:A:小鼠海马区雌激素受体 ERα 和 ERβ 的免疫组化染色结果;B:小鼠海马区雌激素受体 ERα 的平均光密度;C:小鼠海马区雌激素受体 ERβ 的平均光密度。

图3 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠海马区雌激素受体表达的影响($\times 400, \bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. Immunohistochemical staining of ERα and ERβ expression in hippocampus of mice. B. The mean density of ERα expression in hippocampus of mice. C. The mean density of ERβ expression in hippocampus of mice.

Figure 3 Effect of postmenopausal lipid metabolism disorder on estrogen receptor expression in hippocampus of mice($\times 400, \bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠抑郁样行为的影响

绝经后脂质代谢紊乱造模及给药后,对各组小鼠进行了OFT和TST抑郁行为学检测。OFT通过水平运动次数(horizontal locomotor activity, HA)和垂直运动次数(vertical locomotor activity, VA)两个指标评价小鼠抑郁样行为程度;尾悬实验(tail suspension test)通过记录小鼠累积静止不动的时间来反映抑郁状态。结果如图4所示:与WT组相比,WT-H组小鼠水平次数显著增加($P < 0.05$),垂直运动次数未见明显变化,TST累积静止时间(immobilized time, IT)显著延长($P < 0.05$);LDLR^{-/-}组水平运动次数和垂直运动次数均显著减少($P < 0.05$),TST累积静止时间未见显著性差异;LDLR^{-/-}-H组小鼠水平和垂直运动次数显著降低($P < 0.05$),TST累积静止时间显著增加($P < 0.01$)。此外,与LDLR^{-/-}-H组相比较,XF组给予

XF治疗可显著降低小鼠TST累积静止时间($P < 0.01$)。该结果表明绝经后脂质代谢紊乱能诱导小鼠抑郁样行为产生,XF给药能显著改善绝经后脂质代谢紊乱小鼠抑郁样行为。

2.5 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠脑组织5-HT水平的影响

绝经后脂质代谢紊乱造模及给药后,检测各组小鼠脑中5-HT的水平(见图5):与WT组相比,WT-H组小鼠脑中5-HT水平无显著变化,而LDLR^{-/-}组和LDLR^{-/-}-H组小鼠脑中5-HT水平均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);与LDLR^{-/-}-H组相比,XF组小鼠经XF治疗可显著提高脑中5-HT水平($P < 0.05$)。该结果表明绝经后脂质代谢紊乱能诱导小鼠脑内单胺类递质5-HT水平的降低,XF给药能显著恢复绝经后脂质代谢紊乱小鼠脑内5-HT水平。

2.6 绝经后脂质代谢紊乱与抑郁症状相关性分析

进一步探讨绝经后脂质代谢紊乱与抑郁症状

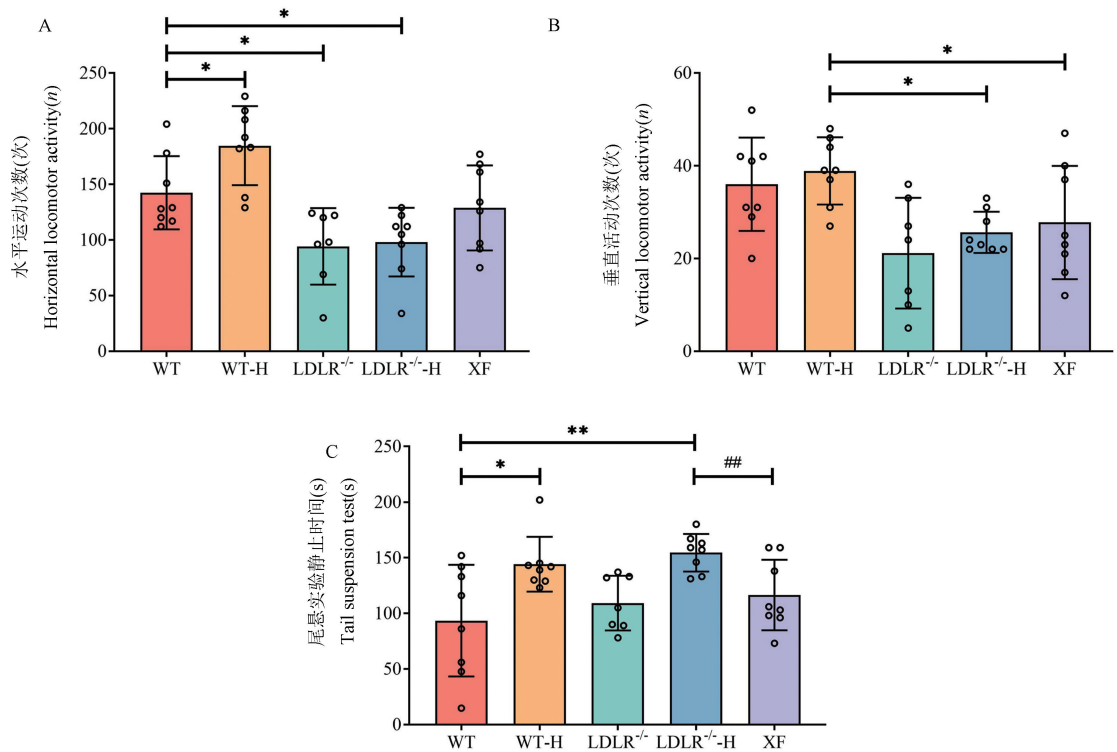
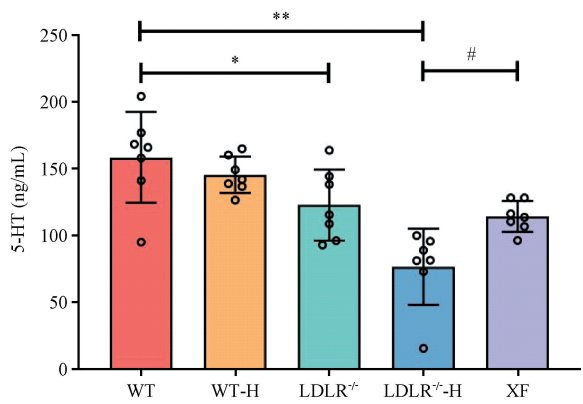


图 4 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠抑郁样行为的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Figure 4 Effect of postmenopausal lipid metabolism disturbance on depression-like behavior in mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注:与 LDLR^{-/-}-H 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 绝经后脂质代谢紊乱对小鼠脑组织 5-HT 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared with LDLR^{-/-}-H group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Effects of postmenopausal lipid metabolism disorders on 5-HT levels in brain tissue of mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

的相关性,对各组小鼠中枢总胆固醇水平和抑郁行为学指标及脑内单胺类递质水平进行相关性分析,结果如图 6 显示,小鼠脑中 TC 含量与脑中神经递质 5-HT 水平呈负相关($r = -0.7332, P < 0.01$);小鼠脑中 TC 含量与小鼠水平运动次数、垂直运动次数呈负相关($r = -0.4384, P < 0.05; r = -0.2962,$

$P > 0.05$),与 TST 累积静止时间成正相关($r = 0.4475, P < 0.05$)。该结果表明小鼠脂质代谢紊乱程度越高,其脑内 5-HT 越低,抑郁样行为特征越明显。

3 讨论

抑郁症的病理形成机制尚未被探究完全,其主要涉及神经-免疫-内分泌等多系统紊乱^[21-22]。有研究表明大脑奖赏厌恶回路中的多巴胺能和谷氨酸能功能异常与抑郁症的形成密切相关^[23],也有研究指出全身慢性炎症状态(如 IL-6、TNF 等细胞因子水平的上升)^[24]及内分泌紊乱(如 HPA 轴改变^[25]、甲状腺激素^[26]、性激素^[27])也参与了抑郁症的发生。近年来有研究表明脂质代谢紊乱与抑郁症的形成密切相关。例如,高脂饮食既可以导致瘦素的升高,从而造成 HPA 轴改变引起抑郁症^[28-29],可以使炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等升高从而诱发抑郁症^[30]。王嫩妮等^[31]发现抑郁症的形成有可能与胰岛素和脂联素水平异常有关。值得注意的是,有报道指出雌激素水平的降低可能导致中枢神经的活性减退,抑制 5-HT 的合成,从而导致抑郁症^[32]。雌激素水平降低是绝经后女性主要特征之一,这种

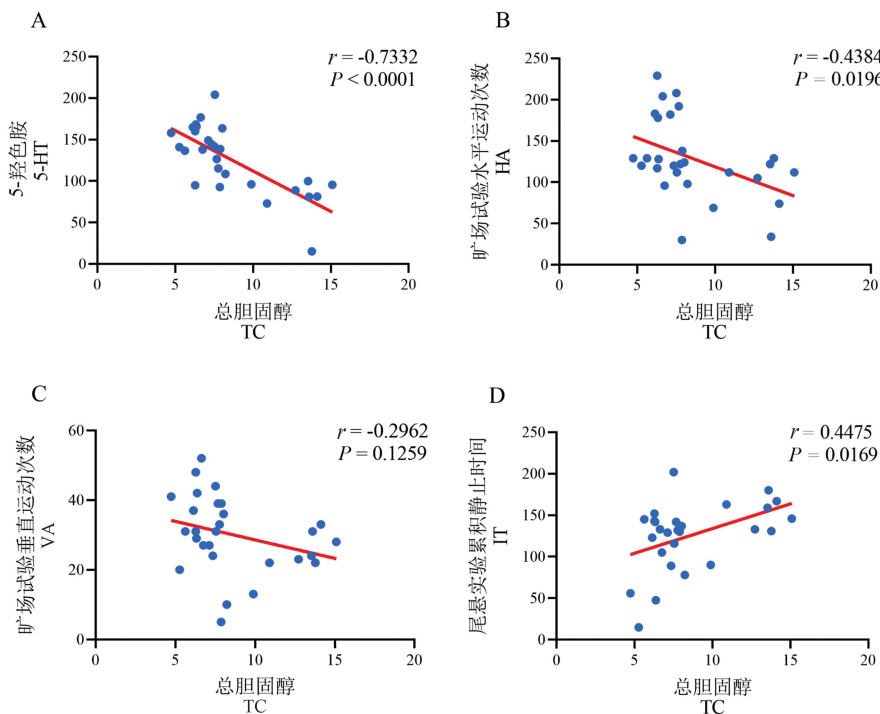


图6 绝经后脂质代谢紊乱与抑郁症相关性分析

Figure 6 Correlation analysis of postmenopausal lipid metabolism disorder and depression

变化会引起脂质合成相关的代谢异常,引起绝经后女性能量和脂质代谢紊乱^[13]。鉴于抑郁症状在绝经期和绝经后女性中极为常见,推测绝经后脂质代谢紊乱可能参与抑郁症状的形成或发生。

本研究利用 LDLR 基因敲除雌鼠双侧卵巢摘除联合高脂饮食建立绝经后脂质代谢异常小鼠模型,评价绝经后脂质代谢紊乱是否可以诱导抑郁症状的形成,以及通过 XF 药物干预脂质代谢紊乱,是否可缓解抑郁样症状。LDLR^{-/-}小鼠可以追溯到 1993 年 Ishibashi 等^[33]的研究,通过同源重组构建了缺乏功能性 LDLR 基因的小鼠,并发现其血浆总胆固醇水平比野生型同窝小鼠高出 2 倍,以此来构建高胆固醇血症模型。也有研究对 LDLR^{-/-}小鼠的特性进行了总结,发现其具有与人类似的脂质代谢异常,并且该病变进展可以通过饮食来控制^[34]。有文献指出,高脂饲料喂养以及 LDLR 基因敲除小鼠均能构建脂质代谢紊乱模型。Liu 等^[35]将 LDLR^{-/-}小鼠通过高脂饮食喂养 12 周构建脂质代谢紊乱模型,结果显示 LDLR^{-/-}小鼠体重增长幅度是对照组的 2 倍,血清总胆固醇水平是对照组的 4 倍,由此可见通过高脂饲料喂养 LDLR^{-/-}构建脂质代谢紊乱模型是可行的。课题组前期利用 LDLR^{-/-}雌鼠进行双侧卵巢摘除手术联合高脂饲料喂养拟建立绝经后脂

质代谢紊乱模型^[36],结果表现为小鼠血清 TC、TG、LDL-C 显著升高,HDL-C 水平显著下降;肝和海马中 TC 和 TG 水平显著升高,提示 LDLR^{-/-}鼠经卵巢摘除联合高脂饮食能引起小鼠脂质代谢紊乱形成。

本研究首先成功复制绝经期脂质代谢紊乱小鼠模型。实验中 WT 鼠或 LDLR^{-/-}去卵巢鼠经 3 个月高脂饲养后,小鼠体重均显著上升,但 LDLR^{-/-}去卵巢给予正常饮食未见体重的显著变化,提示高脂饮食是引起脂质代谢失衡的重要因素之一。为进一步明确 LDLR 基因敲除联合去卵巢及高脂喂养能建立脂质代谢紊乱小鼠模型,随后检测脑匀浆总胆固醇水平,结果显示 LDLR^{-/-}组和 LDLR^{-/-}-H 组的总胆固醇水平较 WT 组有显著的上升,WT-H 组总胆固醇水平有升高的趋势但无显著性差异。这些结果提示 LDLR 基因敲除联合去卵巢及高脂饮食确实能够引起小鼠中枢脂质代谢紊乱,但是仅高脂饮食或仅 LDLR 基因敲除联合去卵巢不一定会引起稳定且显著的脂质代谢紊乱。

此外,本研究也考察了绝经后脂质代谢紊乱模型对小鼠海马区经典雌激素受体 ERα 和 ERβ 表达情况的影响。ERα 和 ERβ 虽然都是经典的雌激素受体,但是两种受体的组织分布、表达情况以及生物学功能各有差异。例如 ERα 主要在卵囊泡膜细

胞和某些基质细胞中表达,而子宫中雌激素受体以 ER β 为主。在一些特定组织细胞中,如甲状腺癌细胞中,ER α 和 ER β 发挥相反的作用^[37],发现绝经后脂质代谢紊乱模型小鼠海马区存在 ER α 和 ER β 表达变化的不同。其中,海马区 ER α 的表达未观察到明显变化,但 XF 干预会引起海马区 ER α 表达水平降低。该结果提示 LDLR 基因敲除和卵巢切除对小鼠海马区 ER α 的表达无明显影响。有报道指出 XF 能够降低 ER α 在肌瘤细胞中的表达^[38],这与研究中发现 XF 组存在 ER α 的表达水平显著下降的现象相一致。值得注意的是,雌激素受体表达也参与神经系统功能的调控,特别是与学习记忆有关的脑区,如皮层、海马和下丘脑等区域以 ER β 的调控为主^[39]。在绝经后脂质代谢紊乱模型小鼠海马区观察到 ER β 的表达水平显著下降,提示该模型存在海马区 ER β 表达的异常,但是 XF 干预对 ER β 的表达水平无明显作用。以上结果说明 LDLR^{-/-} 鼠经双侧卵巢摘除联合高脂饲料喂养能成功复制绝经后脂质代谢紊乱模型。

为了进一步明确绝经后脂质代谢紊乱是否能诱导抑郁症状的形成,采用旷场实验和尾悬实验对绝经后脂质代谢紊乱小鼠的抑郁行为进行评价。两者都是常用的抑郁样行为的评价指标,如林娜等^[40]和 Song 等^[41]的研究中均采用了两种实验评价小鼠抑郁样行为特征。旷场实验是一种观察实验动物进入空旷、黑暗且陌生的环境后的各种行为,评价其包括抑郁样行为在内的神经精神变化的行为学实验;小鼠越是感到恐惧及抑郁,其运动次数也会相应减少。尾悬实验同样是一种用于评估小鼠抑郁状态的行为学实验,体现了小鼠被限制行动后绝望中求生的本能,越是抑郁状态严重则其静止不动的时间增加。旷场实验中,LDLR^{-/-}-H 组和 LDLR^{-/-} 组较 WT 组均表现出水平及垂直运动减少,即明显的抑郁样症状。同时,注意到 WT-H 组小鼠显示出水平运动次数增加的现象。有文献指出,摄入高脂饮食可以通过 ω -3 多不饱和脂肪酸来减轻焦虑抑郁状态,从而改善其社交行为^[42-43],这或许能帮助理解实验结果。在尾悬实验中,LDLR^{-/-}-H 组和 WT-H 组较 WT 组表现出 TST 累积静止时间显著延长,进一步提示绝经后脂质代谢紊乱可引起抑郁样行为。因此上述抑郁行为学评价结果表明绝经后脂质代谢紊乱可诱导小鼠出现对社交、自主探索行为能力的减少,以及绝望情绪的产生。

5-HT 是目前世界公认的与抑郁症相关的一种神经递质^[44]。一般认为抑郁症患者存在神经突触间 5-HT 水平减少。本研究对绝经后脂质代谢紊乱小鼠模型进行脑组织 5-HT 水平的检测,结果发现 LDLR^{-/-} 组和 LDLR^{-/-}-H 组的 5-HT 水平显著下降,WT-H 组亦有下降的趋势,该结果说明绝经后脂质代谢紊乱可引起中枢单胺类神经递质 5-HT 水平的下降,诱导抑郁行为的产生。

XF 是目前临床常用的脂质代谢调控药物,本研究利用 XF 研究调节脂质代谢紊乱是否对抑郁样症状有改善作用。结果显示 XF 给药治疗对 LDLR^{-/-}-H 组小鼠的体重无明显作用,但是 XF 干预会引起小鼠海马区 ER α 表达下降,但是对 LDLR^{-/-}-H 组小鼠 ER β 表达无显著作用;XF 干预可显著降低 LDLR^{-/-}-H 组小鼠脑匀浆胆固醇水平,同时能够显著提高 LDLR^{-/-}-H 组小鼠脑内 5-HT 水平;此外,经 XF 治疗后小鼠 TST 累积静止时间也明显下降。以上结果表明,通过调节改善脂质代谢水平,可以显著缓解绝经后小鼠抑郁样行为。这也进一步提示了绝经后脂质代谢紊乱与抑郁症状形成的相关性。

基于以上发现,进一步对绝经后脂质代谢紊乱模型小鼠脑内总胆固醇水平和小鼠抑郁样症状指标进行相关性分析。其中各组数据都是由全部小鼠数据整合而来,即对每只鼠的 TC 水平和抑郁行为或 5-HT 进行相关性分析,结果显示,5-HT 水平随着小鼠脑内总胆固醇水平升高而愈发降低,并且两者之间呈显著相关性。此外旷场实验中水平运动和垂直运动次数与 TC 水平呈明显负相关,而 TST 尾悬累计不动时间与 TC 水平呈显著正相关。结合上述结果可以得出推论:绝经后脂质代谢紊乱与抑郁症状形成密切相关。

尽管得出了上述推论,但实验过程中仍有不足。首先,没有研究仅卵巢摘除对脂质代谢功能的影响;其次,没有单独研究仅 LDLR 受体敲除 + 正常饮食和 LDLR 受体敲除 + 高脂饮食的脂质代谢特征,这使得在论证高脂饮食是否可引起 LDLR^{-/-} 小鼠脂质代谢紊乱时缺少一定说服力;此外,没有检测外周血胆固醇和甘油三酯等水平,关于其变化是否与脑匀浆中含量变化趋势一致尚未确证。在后期实验中需进一步完善设计,以弥补上述不足之处。

综上所述,实验结果表明绝经后脂质代谢紊乱可引发小鼠抑郁样行为及 5-HT 水平的下降,而通过药物调节脂质代谢紊乱,可有效缓解模型小鼠抑

郁样症状及提高中枢 5-HT 的水平。实验结果初步提示了绝经后脂质代谢异常可以诱导抑郁症状的形成,但具体及更深入的病理机制有待进一步的探索及研究。此外,鉴于脂质代谢紊乱在抑郁症状病理形成中的重要作用,也可进一步探讨调控脂质代谢相关途径是否可成为干预抑郁症状的潜在靶点。

参 考 文 献(References)

- [1] World Health Organisation (WHO). Depression and other common mental disorders global health estimates [R]. 2017.
- [2] Morssinkhof MWL, van Wylick DW, Priester-Vink S, et al. Associations between sex hormones, sleep problems and depression: a systematic review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 118: 669–680.
- [3] 杨艳青, 赵伟田, 李灿秀, 等. 围绝经期抑郁症的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(5): 85–92.
Yang YQ, Zhao WT, Li CW, et al. Research progress of perimenopausal depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(5): 85–92.
- [4] Zeng LN, Yang Y, Feng Y, et al. The prevalence of depression in menopausal women in China: a meta-analysis of observational studies [J]. *J Affect Disord*, 2019, 256: 337–343.
- [5] Papazisis G, Tsakiridis I, Ainzoglou A, et al. Prevalence of post-menopausal depression and associated factors: a web-based cross-sectional study in Greece [J]. *Maturitas*, 2022, 156: 12–17.
- [6] Tian T, Mao Q, Xie J, et al. Multi-omics data reveals the disturbance of glycerophospholipid metabolism caused by disordered gut microbiota in depressed mice [J]. *J Adv Res*, 2022, 39: 135–145.
- [7] Pinto B, Conde T, Domingues I, et al. Adaptation of lipid profiling in depression disease and treatment: a critical review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2032.
- [8] Borsini A, Nicolaou A, Camacho-Muñoz D, et al. *Omega*-3 polyunsaturated fatty acids protect against inflammation through production of LOX and CYP450 lipid mediators: relevance for major depression and for human hippocampal neurogenesis [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(11): 6773–6788.
- [9] Jung J, Lee SM, Lee MJ, et al. Lipidomics reveals that acupuncture modulates the lipid metabolism and inflammatory interaction in a mouse model of depression [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 94: 424–436.
- [10] Zhang K, Wang X, Tu J, et al. The interplay between depression and tuberculosis [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(3): 749–757.
- [11] Jiang W, Gong L, Liu F, et al. Alteration of gut microbiome and correlated lipid metabolism in post-stroke depression [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 663967.
- [12] Dong MX, Feng X, Xu XM, et al. Integrated analysis reveals altered lipid and glucose metabolism and identifies NOTCH2 as a biomarker for Parkinson's disease related depression [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 257.
- [13] Ko SH, Jung Y. Energy metabolism changes and dysregulated lipid metabolism in postmenopausal women [J]. *Nutrients*, 2021, 13(12): 4556.
- [14] Ko SH, Kim HS. Menopause-associated lipid metabolic disorders and foods beneficial for postmenopausal women [J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 202.
- [15] Huang T, Balasubramanian R, Yao Y, et al. Associations of depression status with plasma levels of candidate lipid and amino acid metabolites: a meta-analysis of individual data from three independent samples of US postmenopausal women [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(7): 3315–3327.
- [16] Wu YT, Huang WY, Kor CT, et al. Relationships between depression and anxiety symptoms and adipocyte-derived proteins in postmenopausal women [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0248314.
- [17] Zhao S, Song T, Gu Y, et al. Hydrogen sulfide alleviates liver injury through the S-sulhydrated-kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear erythroid 2-related factor 2/low-density lipoprotein receptor-related protein 1 pathway [J]. *Hepatology*, 2021, 73(1): 282–302.
- [18] Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzi P, et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(12): 1661–1674.
- [19] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1–3): 3–33.
- [20] Can A, Dao DT, Terrillion CE, et al. The tail suspension test [J]. *J Vis Exp*, 2012(59): e3769.
- [21] 贾颖. 抑郁症和肥胖症共同生物标记物的研究现状 [J]. *医学信息*, 2022, 35(6): 68–72.
Jia Y. Research status of common biomarkers for depression and obesity [J]. *Med Inf*, 2022, 35(6): 68–72.
- [22] Milaneschi Y, Simmons WK, van Rossum EFC, et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms [J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(1): 18–33.
- [23] Fox ME, Lobo MK. The molecular and cellular mechanisms of depression: a focus on reward circuitry [J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(12): 1798–1815.
- [24] Beurel E, Toupes M, Nemeroff CB. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble [J]. *Neuron*, 2020, 107(2): 234–256.
- [25] Troubat R, Barone P, Leman S, et al. Neuroinflammation and depression: A review [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 151–171.

- [26] Zhao T, Chen BM, Zhao XM, et al. Subclinical hypothyroidism and depression; a meta-analysis [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 239.
- [27] Nead KT. Androgens and depression; a review and update [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2019, 26(3): 175–179.
- [28] Labban RSM, Alfawaz H, Almnaizel AT, et al. High-fat diet-induced obesity and impairment of brain neurotransmitter pool [J]. *Transl Neurosci*, 2020, 11(1): 147–160.
- [29] Ge T, Fan J, Yang W, et al. Leptin in depression: a potential therapeutic target [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1096.
- [30] la Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity [J]. *Cytokine*, 2017, 98: 51–58.
- [31] 王嫩妮, 崔东红. 抑郁症与肥胖共病的研究进展 [J]. *临床精神医学杂志*, 2016, 26(2): 134–135.
- Wang MT, Cui DH. Research progress on comorbidity of depression and obesity [J]. *J Clin Psychiatry*, 2016, 26(2): 134–135.
- [32] 刘少晓, 李统怀. 产后抑郁症患者雌孕激素水平检测及其与心理状况的相关性 [J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(7): 1213–1215.
- Liu SX, Li TH. Detection of estrogen and progesterone levels in patients with postpartum depression and its correlation with psychological status [J]. *Matern Child Health Care Chin*, 2020, 35(7): 1213–1215.
- [33] Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(2): 883–893.
- [34] Zhao Y, Qu H, Wang Y, et al. Small rodent models of atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110426.
- [35] Liu J, Zhang W, Li Y, et al. Flavonoids extract from the seeds of *Psoralea corylifolia* L. (PFE) alleviates atherosclerosis in high-fat diet-induced LDLR^{-/-} mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153983.
- [36] 孟庆海. 泽泻醇 B 乙酸酯通过调节肠道菌群和肠道雌激素受体抗绝经后动脉粥样硬化的机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2021.
- Meng QH. Study on the mechanism of alisthenol B acetate prevents postmenopausal atherosclerosis by regulating gut microbiota and intestinal estrogen receptor [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2021.
- [37] Chen GG, Vlantis AC, Zeng Q, et al. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(5): 367–377.
- [38] Afrin S, El Sabeh M, Islam MS, et al. Simvastatin modulates estrogen signaling in uterine leiomyoma via regulating receptor palmitoylation, trafficking and degradation [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 172: 105856.
- [39] Zuloaga DG, Zuloaga KL, Hinds LR, et al. Estrogen receptor β expression in the mouse forebrain: age and sex differences [J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522(2): 358–371.
- [40] 林娜, 柳洋, 祁晖, 等. 拉莫三嗪抗抑郁作用及其机制研究 [J]. *济宁医学院学报*, 2018, 41(3): 163–166, 170.
- Lin N, Liu Y, Qi H, et al. The effect of lamotrigine on antidepressant and its mechanism [J]. *J Jining Med Univ*, 2018, 41(3): 163–166, 170.
- [41] Song AQ, Gao B, Fan JJ, et al. NLRP1 inflammasome contributes to chronic stress-induced depressive-like behaviors in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 178.
- [42] Otsuka A, Shiuchi T, Chikahisa S, et al. Sufficient intake of high-fat food attenuates stress-induced social avoidance behavior [J]. *Life Sci*, 2019, 219: 219–230.
- [43] Dornellas APS, Boldarine VT, Pedrosa AP, et al. High-fat feeding improves anxiety-type behavior induced by ovariectomy in rats [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 557.
- [44] Dell’Osso L, Carmassi C, Mucci F, et al. Depression, serotonin and tryptophan [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(8): 949–954.

[收稿日期] 2023-04-02