

刘高源,彭梦薇,罗紫龙,等. 前额皮质 Creb 表达对大鼠抑郁样行为影响的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(12): 8-18.

Liu GY, Peng MW, Luo ZL, et al. Effect of Creb expression in the prefrontal cortex on depressive behavior in rats [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(12): 8-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.12.002

前额皮质 Creb 表达对大鼠抑郁样行为影响的研究

刘高源¹, 彭梦薇¹, 罗紫龙¹, 匡洛逸¹, 陈玉龙¹, 杨铁柱², 吴耀松¹, 刘 燕^{1,3*}

(1.河南中医药大学中医学院(仲景学院),郑州 450046;2.河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)重症医学科,郑州 450000;3.河南中医药大学,河南省豫药全产业链研发协同创新中心,郑州 450046)

【摘要】 目的 观察前额皮质环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cyclic-AMP response element binding protein, Creb)干扰和过表达对大鼠抑郁行为的影响。方法 采用脑立体定位注射造模方法、Western blot、RT-qPCR 和免疫荧光检测技术筛选出可敲降大鼠前额皮质脑区 Creb 表达的腺相关病毒株(adeno-associated virus, AAV)。然后将 40 只大鼠随机平均分为正常(Control)组、束缚(CRS)组、束缚干扰(CRS+AAV1)组、束缚过表达(CRS+AAV2)组,造模期间监测各组大鼠体重和摄食量。造模结束后采用糖水消耗、高架十字、强迫游泳和旷场对大鼠行为学改变进行监测;采用 ELISA 方法测定各组大鼠前额皮质 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和皮质酮(corticosterone, CORT)含量。结果 Western blot 和免疫荧光检测结果均显示,干扰 2(shRNA2)组 Creb 蛋白表达较其他组均显著降低($P<0.05$),RT-qPCR 实验结果显示干扰 2 组 Creb mRNA 表达较其余 3 组显著降低($P<0.01$),因此选择 AAV-Creb1-shRNA2 病毒株用于后续敲降 Creb 造模。大鼠经脑立体定位注射 Creb 敲降和高表达 AAV 后,束缚干扰组大鼠摄食量较其他组自束缚应激第 2 周开始出现显著降低($P<0.01$),体重增长缓慢,新环境探索欲望和快感下降,绝望和紧张行为明显增加,前额皮质 5-HT、NE 的水平显著降低($P<0.01$),而 CORT 水平显著升高($P<0.01$)。而注射 AAV-Creb1 病毒株可在一定程度上逆转以上抑郁样行为和相关神经递质水平的改变。结论 前额皮质 Creb 表达降低可加重大鼠的抑郁程度,而其表达升高可在一定程度上减轻大鼠的抑郁程度,进一步确证前额皮质 Creb 是参与抑郁症发病的重要靶点之一,可为今后抑郁症动物基因模型构建及发病机制研究提供思路和参考。

【关键词】 Creb;前额皮质;腺相关病毒;抑郁症;行为学;神经递质

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 12-0008-11

Effect of Creb expression in the prefrontal cortex on depressive behavior in rats

LIU Gaoyuan¹, PENG Mengwei¹, LUO Zilong¹, KUANG Luoyi¹, CHEN Yulong¹, YANG Tiezhu²,
WU Yaosong¹, LIU Yan^{1,3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine (Zhongjing College), Zhengzhou 450046, China. 2. Department of Critical Care Medicine, Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province (Henan Orthopedic Hospital), Zhengzhou 450000. 3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Pharmaceutical Industry Chain R&D Collaborative Innovation Center, Zhengzhou 450046)

【基金项目】 国家自然科学基金(82104717);河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-11, HSRP-DFCTCM-2023-8-30);河南省科技厅河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(232102310443);2023 年河南省博士后科研资助项目(03104157-2024-3);2024 年度省级科技研发计划联合基金(优势学科培育类)(242301420099)。

【作者简介】 刘高源(1994—),男,硕士研究生,研究方向:中医方证基础研究。E-mail:17513255778@163.com

【通信作者】 刘燕(1984—),女,博士,高级实验师,硕士生导师,研究方向:情志方证基础研究。E-mail:hnyan@163.com

[Abstract] Objective To observe the influence of Creb protein over-expression and under-expression in the prefrontal cortex on depressive behavior in rats. **Methods** Adeno-associated virus (AAV) strains that can knock down Creb expression in the prefrontal cortex of rats were injected using the stereotaxic injection method and screened by Western blot, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunofluorescence. Forty rats were divided randomly into Control, chronic restraint stress (CRS), CRS combined with AAV interference (CRS+AAVI), and CRS combined with AAV overexpression (CRS+AAVO) groups. The body weight and food intake of the rats in each group were monitored during establishment of the animal model. After establishment of the model, behavioral changes in the rats were monitored by sucrose preference, elevated plus maze, forced swimming, and open field tests. The 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE), and corticosterone (CORT) contents in the prefrontal cortex of rats in each group were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Western blot and immunofluorescence showed that Creb protein expression was significantly reduced in the short hairpin RNA2 (shRNA2) knockdown groups compared with the other groups ($P<0.05$). RT-qPCR showed that Creb mRNA expression was also significantly reduced compared with the other three groups ($P<0.01$). The AAV-CREB1-shRNA2 virus strain was therefore selected for subsequent Creb-knockdown experiments in this study. After modeling, the food intake of rats in the CRS+AAVI group was significantly reduced compared with the other groups ($P<0.01$). Rats in this group also showed slow weight gain and decreased desire to explore new environments, significantly increased despair and nervous behavior, and significantly decreased 5-HT and NE levels ($P<0.01$) and significantly increased CORT levels in the prefrontal cortex ($P<0.01$). These depressive behaviors and associated neurotransmitter levels were reversed in the CRS+AAVO group. **Conclusions** Lower expression of Creb in the prefrontal cortex can aggravate the degree of depression in rats, while high expression of Creb can alleviate depression to a certain extent. These result confirm that Creb expression in the prefrontal cortex is an important target in the pathogenesis of depression, thus providing ideas and references for the construction of animal gene models and further studies of the pathogenesis of depression.

[Keywords] Creb; prefrontal cortex; adeno-associated virus; depression; behavior; neurotransmitters

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

抑郁症又称抑郁障碍,以明显而持久的心境低落为主要临床特征,属情感性精神障碍。预计到2030年抑郁症可能成为人类第二大疾患^[1]。环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cyclic-AMP response element binding protein, Creb)是富含亮氨酸拉链结构的超家族成员,由341个氨基酸残基构成,相对分子质量43 kDa。近年来,以Creb及其相关信号通路作为切入点,探讨抑郁症机制的研究越来越多。作为多条细胞信号转导通路的交汇点,Creb在抑郁症的发生及治疗中发挥重要作用^[2]。Creb与抑郁症密切相关,对神经系统的可塑性、大脑记忆起重要作用^[3]。

Creb在大脑中不同区域升高或降低对抑郁样行为的影响是不同的^[4]。研究结果表明,各种抗抑郁药物增加了海马内的Creb活性进而产生抗抑郁效应^[5-7]。相反,伏隔核中Creb活性的升高会在啮齿类动物中产生各种抑郁样效应^[8]。Creb的表达不仅存在大脑区域的差异性,也存在时间的差异性^[9]。前额皮质中Creb的表达对行为能力的影响尚未有系统性报道。本文筛选出可降低前额皮质Creb表达的腺相关病毒株,通过前额皮质定位注射

方法构建前额皮质Creb干扰和过表达大鼠模型,初步探讨前额皮质Creb的表达对大鼠抑郁样行为的影响,为抑郁症研究相关模型的构建提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用80只6~8周龄SPF级SD雄性大鼠(体重180~200 g)先后购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2024-0003]。所有大鼠均饲养于河南中医药大学动物实验中心SPF级动物房[SYXK(豫)2021-0015],饲养环境温度(24±2)℃,湿度30%~50%。本实验经过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审核(DWLL20210310),本实验设计、动物饲养和实验操作等所有过程均遵循3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂有青霉素钾(河南双实商贸有限公司,批号:兽字药140051253);玻璃离子水门汀(上海荣祥齿科材料有限公司,批号:170401);腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的VA060-AAV-U6-MCS-CMV-ZsGreen-Creb1 shRNA病毒

(3.65×10^{12} vg/mL) 及 VA056-AAV-CMV-MCS-T2A-mcherry-Creb1 病毒(3.65×10^{12} vg/mL) (通用生物, 批号: V3322556); 蛋白酶抑制剂 (Solarbio 公司, 批号: 2312003); 磷酸酶抑制剂混合液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号: 017A1268); RIPA 裂解液 (Solarbio 公司, 批号: 20230908); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (BOSTER 公司, 批号: 18L07A97); 膜再生液 (Solarbio 公司, 批号: 240001001); 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号: 03791900); ECL 显影液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号: 03771450); 反转录试剂盒 (Toyobo 公司, 批号: 256200); TRIzol (Invitrogen 公司, 批号: 98597101); $2 \times$ SYBR Green (武汉 Abclonal 公司, 批号: 962303G12W11); 5-HT ELISA 试剂盒 (MEIMIAN, 批号: MM-0443M2); NE ELISA 试剂盒 (MEIMIAN, 批号: MM-0876M2); CORT ELISA 试剂盒 (MEIMIAN, 批号: MM-0061M2); β -actin Anti-body (ProteintechGroup 公司, 批号: 10029234); Creb Anti-body (CST 公司, 批号: 9197S); HRP 标记山羊抗兔与 HRP 标记山羊抗鼠 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号: 02781115)。ZS-FD 型脑立体定位仪 (北京众实科技有限公司); STRONG 102 型高速颅骨钻 (北京众实迪创科技有限公司); TYD01 型微量注射泵 (北京众实科技有限公司); PowerPac Basic 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); ELx-800 型多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); NANO DROP ONE 型超微量分光光度计 (Thermo 公司); 全自动生物组织脱水和石蜡包埋机 (Thermo 公司); DM750 型生物显微镜 (德国 LEICA); Universal Hood II 型凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司); QuantStudio 6 Flex 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); DFC450C 型倒置显微镜 (德国 Laica 公司); VisuTrack 动物行为分析软件 (上海欣软信息科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 AAV-Creb1-shRNA 筛选及验证

(1) 动物分组及 AAV 病毒注射

将 40 只 SD 大鼠, 随机分为空载 (shRNA0) 组、干扰 1 (shRNA1) 组、干扰 2 (shRNA2) 组、干扰 3 (shRNA3) 组, 每组各 10 只。分别通过脑立体定位仪注射 AAV-Creb1-shRNA0、AAV-Creb1-shRNA1、AAV-Creb1-shRNA2、AAV-Creb1-shRNA3 至大鼠前额皮质部位。注射部位根据 Paxinos-Watson 大鼠脑

立体定位图谱, 确定前额皮质的三维坐标, 并用脑立体定位仪测定两侧前额皮质位置并迅速标记 (前额皮质定位: AP 4.2 mm, ML $\pm$ 2.0 mm, DV 2.0 mm)。用高速颅骨钻在两侧前额皮质钻孔, 用微量注射泵以 $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ 各泵入 $2 \mu\text{L}$ 腺相关病毒。注射完成后予玻璃离子水门汀封住钻孔, 手术针线缝合皮肤, 于大腿内侧肌肉注射青霉素钾 (16 万单位/只) 3 d, 转染 4 周后, 取各组大鼠前额皮质, 其中每组 5 只大鼠前额皮质分离后分装, 用于 Western blot 与 RT-qPCR 检测, 其余 5 只大鼠取全脑行免疫荧光检测。

(2) Western blot 检测各组大鼠前额皮质 Creb 蛋白表达

称量各组大鼠前额皮质组织 50 mg, 依次加入蛋白酶抑制剂 $5 \mu\text{L}$ 、磷酸酶抑制剂 $5 \mu\text{L}$ 与 RIPA 裂解液 $500 \mu\text{L}$, $6500 \text{ r}/\text{min}$ 充分匀浆, 4°C $13\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min, 分离上清。BCA 法测定蛋白浓度并均衡蛋白至同一浓度。一步法配置 10% 下层胶与上层胶, 每孔上样 $3 \mu\text{L}$, 60 V 电泳 30 min 后 100 V 电泳 60 min, 200 mA 转膜 60 min, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 Creb 一抗 (1:1000), 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, 加入兔二抗 (1:3000), 室温孵育 60 min, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, 曝光显影, 拍照, 保存图像。然后膜再生液中浸泡 30 min, 用 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 2 h 后, 分别加入内参一抗 β -actin (1:1000), 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, 加入鼠二抗 (1:3000), 室温孵育 60 min, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, 曝光显影, 采用 Image Lab 图像分析系统对目的条带进行灰度值分析。

(3) 免疫荧光检测各组大鼠前额皮质 Creb 蛋白表达

用水将石蜡切片脱蜡煮沸进行抗原修复 20 min, 用 3% 过氧化氢阻断 15 min, 5% 羊血清 + 0.5% PBST 封闭, Creb 一抗 4°C 孵育过夜。0.1% PBST 洗片 3 次, 每次 5 min, 兔二抗避光孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 封片, 免疫荧光显微镜观察。

(4) RT-qPCR 检测各组大鼠前额皮质 Creb mRNA 表达

取各组大鼠 50 mg 前额皮质, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度, 用无酶水均衡成同一浓度至 $10 \mu\text{L}$ 体系, 而后 95°C 5 min, 37°C 15 min 下进行反转录。用实

时荧光定量 PCR 仪进行扩增循环,反应条件依次设定为:95 ℃ 3 min,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s 循环 40 次,60 ℃ 逐渐升温至 95 ℃ 15 s,循环 71 次。每个样本设置 3 个副孔,采用 2^{-ΔΔCt} 进行计算目的基因表达倍数。引物由郑州点晴科技公司设计,序列见表 1。

1.3.2 观察前额皮质 Creb 表达对大鼠行为学的影响

(1)大鼠模型构建

40 只 SD 大鼠随机分为正常 (Control) 组、束缚 (chronic restraint stress, CRS) 组、束缚干扰 (chronic restraint stress combined with adeno-associated virus interference, CRS + AAVI) 组、束缚过表达 (chronic restraint stress combined with adeno-associated virus overexpression, CRS+AAVO) 组,每组各 10 只。正常组与束缚组经前额皮质注射 AAV-Creb1-shRNA0,束缚干扰组注射筛选可敲降 Creb 的 AAV-Creb1-shRNA2 病毒,束缚过表达组注射 Creb 高表达的 AAV-Creb1 病毒株,注射部位、用量及术后处理同 1.3.1 中第一部分。手术结束后,各组大鼠恢复 1 周,除正常组除外,其余各组大鼠均接受慢性束缚应激方法造模 3 周^[10]。

(2)各组大鼠体重和摄食量监测

自束缚应激造模开始,对 各组大鼠体重、摄食量进行连续监测,每周 1 次。

(3)各组大鼠行为学监测

行为学监测均在河南中医药大学动物实验中心进行,环境温度 22~26 ℃,相对湿度 30%~40%,氨浓度≤14 mg/m³,噪声≤60 dB(A),动物照度 15~20 Lux。

糖水偏好试验:糖水实验于慢性束缚应激后第 21 天进行,试验前先训练大鼠适应含糖饮水。正式进行糖水消耗实验时,每组大鼠各给予 280 g 纯水和 1%蔗糖水,大鼠自由饮水 12 h 后取出两个水瓶,分别称量糖水与纯水的消耗量,并采用以下公式计算糖水偏嗜度:糖水偏嗜度/%=糖水消耗质量/消耗总液体质量×100%。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
Creb	F: GAGCAGACAACCAGCAGAGT
	R: AATCTGTGGCTGGGCTTGAA
β-actin	F: GTCGTACCACTGGCATTGTG
	R: CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

高架十字迷宫试验:高架十字迷宫距离地面 50 cm,由 2 个开放臂区域和 2 个封闭臂区域组成。实验开始时,将大鼠放在中央区面朝开合臂区,松手时开始记录大鼠 5 min 内的运动轨迹,让大鼠自由探索 4 条区域。通过比较大鼠在开放臂区停留时间及开放臂区探索次数,从而探讨大鼠抑郁程度。

旷场试验:将大鼠放置于敞箱 (规格:长 100 cm×宽 100 cm×高 50 cm) 底部中心位置,并以摄像头持续监测大鼠 5 min 的活动情况,通过软件分析大鼠移动总距离、中央区进入次数及时间和站立次数并判断大鼠的行为改变。

强迫游泳试验:实验前 1 d,将大鼠放入透明圆柱形玻璃桶中,注水高度为 40 cm,游泳 10 min 以适应实验环境。实验时将大鼠放入上述玻璃桶中游泳,视频监控 5 min 内大鼠活动状态。分析每只大鼠 5 min 内不动时间及次数等判定大鼠的行为学改变。

(4) ELISA 方法检测各组大鼠前额皮质 5-HT、NE 和 CORT 含量

称取 100 mg 前额皮质,加入 0.9 mL pH=7.2~7.4 PBS 中,匀浆器充分匀浆,4 ℃离心 20 min (3000 r/min),取上清。在待测样品孔先加样品稀释液每孔 40 μL,然后再加待测样品 10 μL (样品最终稀释度为 5 倍),每个样品设置 3 个复孔,于标准孔加入按梯度稀释的标准品每孔 50 μL,每孔加入抗体工作液 100 μL,37 ℃温育 30 min,洗涤 5 次,拍干,加酶结合工作液每 50 μL,37 ℃温育 30 min,洗涤 5 次,拍干,加入显色工作液每孔 100 μL,37 ℃避光孵育 10 min,加终止液每孔 50 μL,立即于酶标仪 450 nm 波长处依序测量各孔 OD 值,根据说明书求出各样本的实际蛋白浓度。

1.4 统计学方法

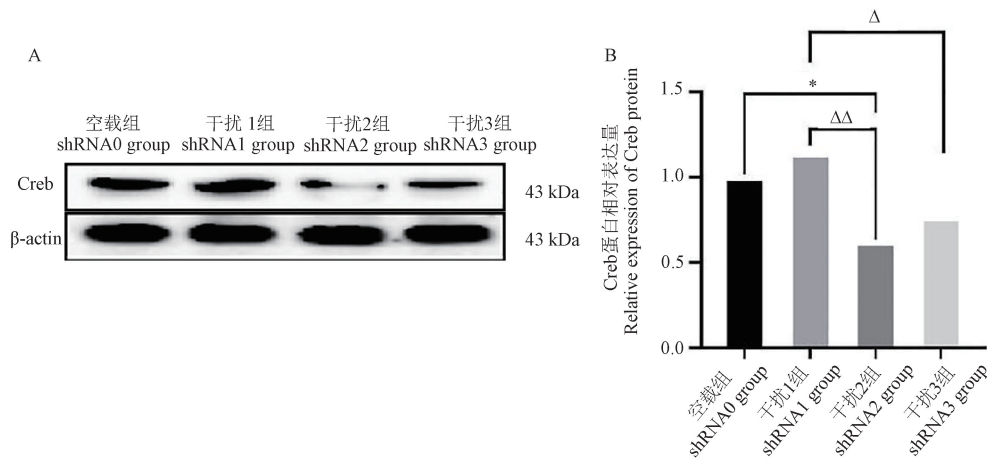
采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。所有统计数据均采用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,均采用方差齐性检验,方差齐且符合正态分布用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,反之两两比较采用 t 检验。以 P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AAV-Creb1-shRNA 筛选结果

2.1.1 Western blot 检测结果

从图 1 可知,与空载组比较,干扰 2 组 Creb 蛋白表达显著减少 (P<0.05);与干扰 1 组比较,干扰



注:A:Western blot 检测 Creb;B:Creb 蛋白相对表达量统计。与空载组相比, * $P<0.05$;与干扰 1 组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠前额皮质 Creb 蛋白表达情况

Note. A, Western blot for Creb. B, Statistics of relative expression of Creb protein. Compared with the shRNA0 group, * $P<0.05$. Compared with shRNA1 group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

Figure 1 Creb protein expression in the prefrontal cortex of rats in each group

2 组和干扰 3 组大鼠前额皮质 Creb 蛋白表达均显著减少($P<0.01$, $P<0.05$)。

2. 1. 2 RT-qPCR 检测结果

从图 2 可知,与空载组比较,干扰 1 组大鼠前额皮质 Creb mRNA 表达量显著升高($P<0.05$),干扰 2 组 Creb mRNA 表达显著降低($P<0.01$);与干扰 1 组比较,干扰 2 组和干扰 3 组大鼠前额皮质 Creb mRNA 的表达显著降低($P<0.001$, $P<0.01$);

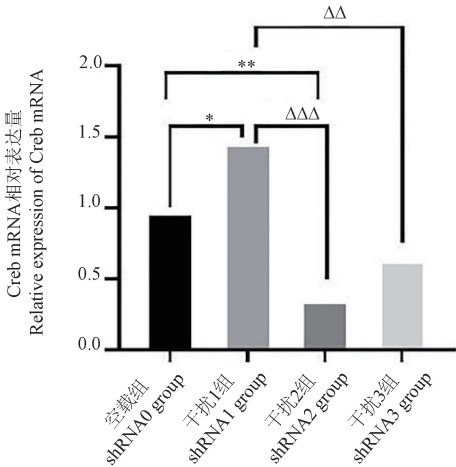
2. 1. 3 免疫荧光检测结果

从图 3 可知,与空载组比较,干扰 1 组大鼠前额皮质 Creb 免疫荧光 OD 值较空载组显著增加($P<0.05$),干扰 2 组大鼠前额皮质 Creb 免疫荧光 OD 值较空载组显著减少($P<0.001$);与干扰 1 组比较,干扰 2 组与干扰 3 组 Creb 免疫荧光 OD 值显著降低($P<0.0001$, $P<0.01$);与干扰 2 组比较,干扰 3 组 Creb 免疫荧光 OD 值组显著升高($P<0.001$)。

2. 2 前额皮质 Creb 干扰和过表达对大鼠行为学的影响

2. 2. 1 各组大鼠体重监测结果

从表 2 可知,各组大鼠束缚应激造模前(第 0 天)体重无显著差异。束缚应激造模第 7 天时,与正常组比较,其余 3 组大鼠体重均显著下降($P<0.01$, $P<0.05$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠体重显著下降($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠体重显著增加($P<0.01$)。束缚应激造模第 14 天,与正常组比较,其余 3 组大鼠体重均显著减轻($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠



注:与空载组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与干扰 1 组相比, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$ 。

图 2 大鼠前额皮质 Creb mRNA 表达结果

Note. Compared with the shRNA0 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with shRNA1 group, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$.

Figure 2 Results of Creb mRNA expression in rat prefrontal cortex

体重显著减轻($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠体重显著增加($P<0.01$)。束缚应激造模第 21 天时,与正常组比较,其余 3 组大鼠体重均显著减轻($P<0.05$, $P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠体重显著减轻($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠体重显著增加($P<0.01$)。从图 4 可看出,正常组大鼠体重增长最快,而束缚干扰组大鼠体重增长最慢。

2. 2. 2 各组大鼠摄食量监测结果

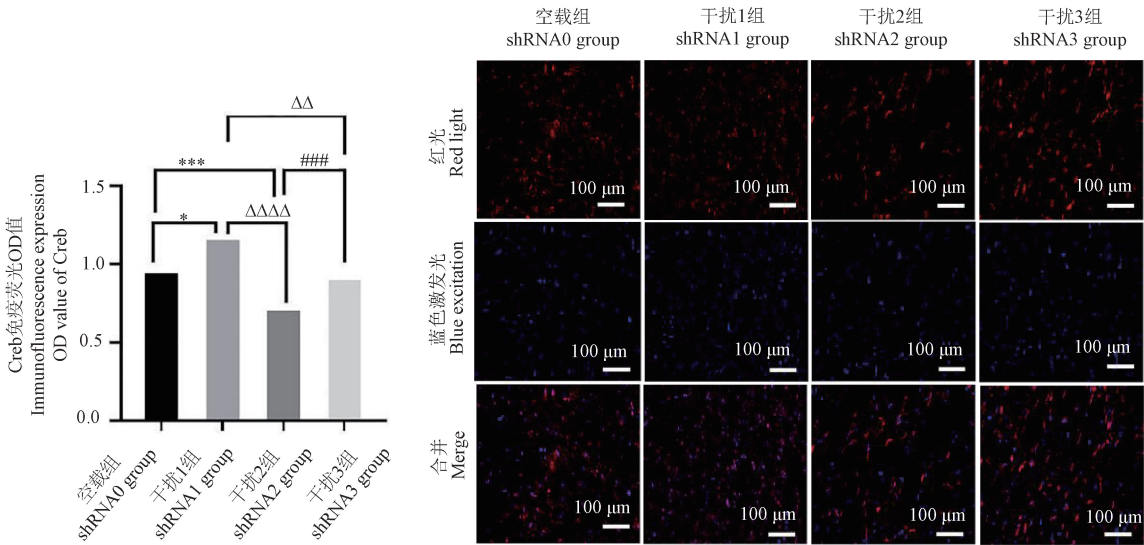
从表 3 可知,造模前和造模第 1 周结束后,各组大鼠摄食量变化无明显差异。造模第 2 周后,与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠摄食量显著减少($P<0.01$);与束缚组和束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠摄食量均显著增加($P<0.05,P<0.01$)。造模第 3 周后,与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠摄食量显著降低($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠体重显著减少($P<0.05$),而束缚过表达组大鼠摄食量显著增加($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠摄食量显著增加($P<$

0.01)。从图 5 可看出,正常组大鼠摄食量增长趋势最明显,束缚过表达组次之,而束缚干扰组和束缚组大鼠摄食量自造模一周后均出现明显的下降趋势。

2. 2. 3 各组大鼠行为学监测结果

(1)糖水实验

与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠糖水偏嗜度显著降低($P<0.05,P<0.001$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠糖水偏嗜度显著降低($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠糖水偏好显著增加($P<0.001$)。具体见图 6。



注:A:Creb 免疫荧光 OD 值统计;B:免疫荧光检测 Creb。与空载组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与干扰 1 组相比, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.0001$;与干扰 2 组相比, ### $P<0.001$ 。

图 3 大鼠前额皮质 Creb 免疫荧光表达

Note. A, Statistics of the OD value of Creb immunofluorescence expression. B, Immunofluorescence for Creb. Compared with the shRNA0 group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with shRNA1 group, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.0001$. Compared with ShRNA2 group, ### $P<0.001$.

Figure 3 Immunofluorescence expression of Creb in rat prefrontal cortex

表 2 各组大鼠体重监测统计学描述($\bar{x}\pm s,g$)				
Table 2 Statistical description of body weight monitoring of rats in each group($\bar{x}\pm s,g$)				
组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21
正常组 Control group	408.00±28.10	465.88±19.16	487.50±19.68	502.10±22.57
束缚组 CRS group	393.30±18.69	425.18±14.90**	439.70±10.38**	448.80±10.65**
束缚干扰组 CRS+AAVI group	393.50±16.31	395.60±15.70** $\Delta\Delta$	400.50±18.43** $\Delta\Delta$	407.00±13.95** $\Delta\Delta$
束缚过表达组 CRS+AAVO group	399.30±24.03	441.70±30.35*##	457.30±28.78**##	478.60±28.12*##

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与束缚组相比, $\Delta\Delta P<0.01$;与束缚干扰组相比, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the CRS group, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with the CRS+AAVI group, ## $P<0.01$.

(2)高架十字实验

如表 4 和图 7 所示,与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠开放臂运动距离显著减少($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠开放臂运动距离显著减少($P<0.05$),而束缚过表达组显著增加($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠开放臂运动距离显著增加($P<0.01$)。

与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠开放臂访问时间显著减少($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠开放臂访问时间显著减少($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠开放臂区域

访问时间显著增加($P<0.05$)。

(3)强迫游泳实验

与正常组比较,其余 3 组大鼠 5 min 内漂浮时间显著增加($P<0.01,P<0.05$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠 5 min 内漂浮时间显著增加($P<0.05$),而束缚过表达组显著减少($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠 5 min 内漂浮时间显著减少($P<0.01$)。

与正常组和束缚组比较,束缚干扰组大鼠 5 min 内漂浮次数均显著增加($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠 5 min 内漂浮次数显著减少

表 3 各组大鼠摄食量监测统计学描述($\bar{x}\pm s,g$)
Table 3 Statistical description of food intake monitoring of rats in each group($\bar{x}\pm s,g$)

组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21
正常组 Control group	38.15±0.07	39.47±0.53	41.97±1.74	43.47±1.48
束缚组 CRS group	36.53±1.60	38.28±1.22	37.19±1.31**	36.75±2.57**
束缚干扰组 CRS+AAVI group	36.26±0.97	38.77±2.67	36.00±0.64**	32.41±0.28** ^Δ
束缚过表达组 CRS+AAVO group	38.27±1.69	39.65±2.24	41.10±2.18 ^{Δ##}	43.34±3.18 ^{ΔΔ##}

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与束缚组相比,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$;与束缚干扰组相比,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with the CRS group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$. Compared with the CRS+AAVI group, ^{##} $P<0.01$.

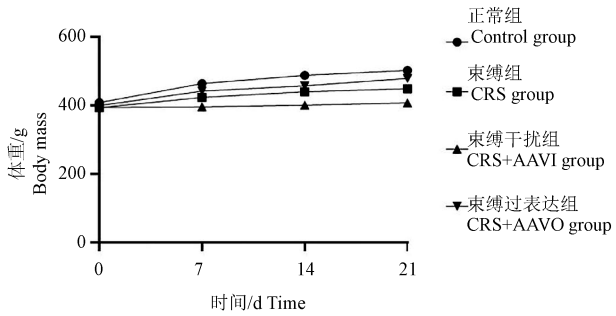


图 4 大鼠体重变化趋势

Figure 4 Trend in body weight of rats

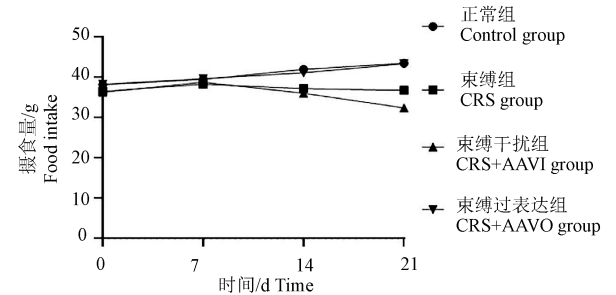


图 5 大鼠摄食量变化趋势图

Figure 5 Trend chart of food intake in rats

表 4 大鼠高架十字实验统计学描述($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Statistical description of elevated plus maze test in rats

组别 Groups	开臂区路程/cm Open arm area distance	开臂区访问时间/s Open-arm zone access time
正常组 Control group	1274.82±770.00	30.86±13.52
束缚组 CRS group	211.90±128.81**	10.99±7.12**
束缚干扰组 CRS+AAVI group	102.96±158.94** ^Δ	5.49±11.76** ^Δ
束缚过表达组 CRS+AAVO group	812.54±603.36 ^{Δ##}	20.69±18.22 [#]

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与束缚组相比,^Δ $P<0.05$;与束缚干扰组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with the CRS group, ^Δ $P<0.05$. Compared with the CRS+AAVI group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

($P<0.01$)。具体见表 5。

(4)旷场实验

与正常组比较,其余 3 组总运动距离均显著减少($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组总运动距离显著减少($P<0.05$),而束缚过表达组总运动距离显著增加($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组总运动距离显著增加($P<0.01$)。

与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠中央区停留时间显著减少($P<0.05, P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠中央区停留时间显著增加($P<0.01$)。

与正常组比较,其余 3 组大鼠中央区进入次数均显著减少($P<0.01, P<0.05$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠中央区进入次数显著减少($P<0.05$),而束缚干扰组显著增加($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠中央区进入次数显著增加($P<0.01$)。

与正常组比较,其余 3 组大鼠站立次数均显著减少($P<0.01, P<0.05$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠站立次数显著减少($P<0.05$),而束缚过表达组大鼠站立次数显著增加($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠站立次数显著增加($P<0.01$)。具体见表 6 和图 8。

2.2.4 大鼠前额皮质 5-HT、NE 和 CORT 含量

与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠前额皮质 5-HT 含量显著减少($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠前额皮质 5-HT 含量显著减少,而束缚过表达组显著增加($P<0.05$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠前额皮质 5-HT 含量显著增加($P<0.01$)。

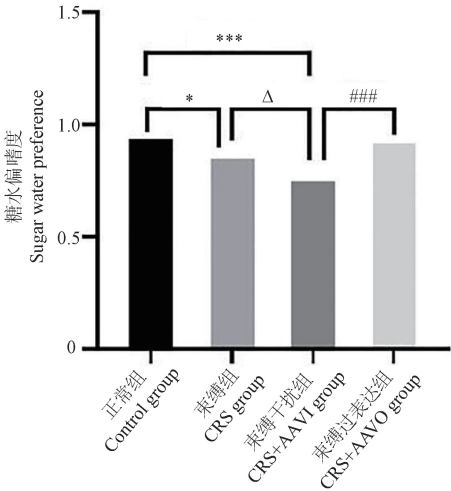
与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠前额皮质 NE 含量显著减少($P<0.01$);与束缚组和束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠前额皮质 NE 含量显著增加($P<0.05, P<0.01$)。

与正常组比较,束缚组和束缚干扰组大鼠前额皮质 CORT 含量显著升高($P<0.01$);与束缚组比较,束缚干扰组大鼠前额皮质 CORT 含量显著增加($P<0.05$),而束缚过表达组显著降低($P<0.01$);与束缚干扰组比较,束缚过表达组大鼠前额皮质 CORT 含量显著降低($P<0.01$)。具体见表 7。

表 5 大鼠强迫游泳统计学描述($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	漂浮时间/s Floating time	漂浮次数/n Floating times
正常组 Control group	98.34±57.24	33.00±5.33
束缚组 CRS group	216.93±59.25 **	44.70±19.14
束缚干扰组 CRS+AAVI group	275.10±65.80 ** ^Δ	61.60±19.01 ** ^Δ
束缚过表达组 CRS+AAVO group	155.86±63.31 * ^Δ ##	35.20±10.63 ##

注:与正常组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与束缚组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与束缚干扰组相比, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the CRS group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with the CRS+AAVI group, ## $P<0.01$.



注:与正常组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与束缚组相比, $^{\Delta}P<0.05$;束缚干扰组相比, ### $P<0.001$ 。

图 6 大鼠糖水偏嗜度监测结果

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with the CRS group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with the CRS+AAVI group, ### $P<0.001$.

Figure 6 Results of sugar water preference in rats

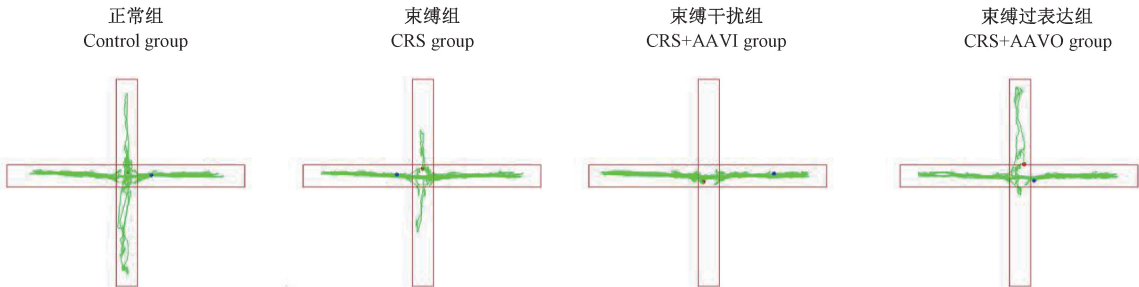


图 7 大鼠高架十字实验轨迹图

Figure 7 Trajectory of the elevated plus maze test in rats

表 6 大鼠旷场实验统计学描述($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Statistical description of open field test in rats

组别 Groups	总运动距离/mm Total movement distance	中央区停留时间/s Central residence time	中央区进入次数/ <i>n</i> Number of central area entry	站立次数/ <i>n</i> Number of stands
正常组 Control group	30379.68±7448.37	28.24±6.65	5.50±0.84	21.80±6.66
束缚组 CRS group	11794.91±5963.42**	8.34±2.10*	2.00±1.49**	8.00±4.83**
束缚干扰组 CRS+AAVI group	10008.85±4960.50**Δ	1.20±1.38**	0.80±0.63**Δ	2.90±1.28**Δ
束缚过表达组 CRS+AAVO group	17743.73±6172.05**Δ##	23.50±37.01##	3.40±1.50*Δ##	13.40±7.08*Δ##

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与束缚组相比,Δ $P<0.05$;与束缚干扰组相比,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with the CRS group,Δ $P<0.05$. Compared with the CRS+AAVI group,## $P<0.01$.

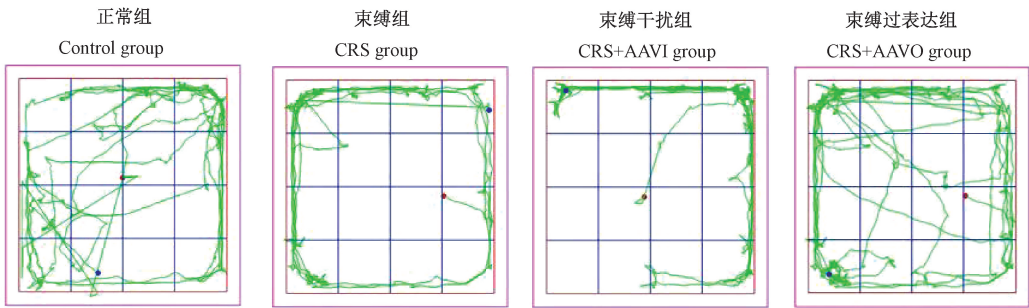


图 8 大鼠旷场实验轨迹图
Figure 8 Trajectory of rat in the open field test

表 7 大鼠前额皮质 5-HT、NE 和 CORT 水平统计学描述($\bar{x}\pm s$,ng/g)
Table 7 Statistical description of 5-HT, NE and CORT levels in prefrontal cortex of rats($\bar{x}\pm s$,ng/g)

组别 Groups	5-HT	NE	CORT
正常组 Control group	417.53±22.95	174.18±4.58	59.53±4.19
束缚组 CRS group	236.02±63.43**	121.36±16.63**	87.69±2.55**
束缚干扰组 CRS+AAVI group	170.85±57.77**Δ	116.69±13.42**	101.04±14.57**Δ
束缚过表达组 CRS+AAVO group	337.57±45.20Δ##	167.17±2.43Δ##	67.82±3.45Δ##

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与束缚组相比,Δ $P<0.05$;与束缚干扰组相比,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with Control group,** $P<0.01$. Compared with the CRS group,Δ $P<0.05$. Compared with the CRS+AAVI group,## $P<0.01$.

3 讨论

Creb 是一种细胞核内调控因子,它可以通过自身磷酸化实现调节转录。研究表明,参与抑郁症和抗抑郁药作用的多条信号转导通路最终都可以激活 Creb,改变 Creb 下游分子表达从而影响神经元存活、再生等可塑性改变,发挥抗抑郁作用^[11]。Dwivedi 等^[12]发现额叶皮层 Creb 的表达、腺苷酸环化酶活性在重症抑郁症患者中均下降。Li 等^[13]研究发现慢性应激模型小鼠注射氟西汀后可提高皮质、海马和下丘脑部位 Creb mRNA 水平。这表明相

关脑区 Creb 是抑郁症发病和药物干预的一个重要靶点。Creb 作为抗抑郁治疗的分子汇聚点,多条经典的信号通路参与了 Creb 的激活,包括 cAMP-PKA-CREB 通路、PI3K-Akt-GSK3β-CREB 通路、Ca²⁺钙调蛋白激酶 IV (CaMK IV)-CREB 通路、Ras-Raf-MAPK-p90RSK-CREB 通路、多巴胺介导的信号通路和 D2 多巴胺受体 (D2R)-CREB-BDNF-TrkB 等^[14-15]。如一线抗抑郁药物氯胺酮通过激活小胶质细胞中 ERK-NRBP1-CREB-BDNF 通路,在 CSDS 易感小鼠中发挥抗抑郁样作用^[16]。二甲双胍可通过激活 AMPK/CREB 信号通路发挥抗抑郁作用^[17]。

但是 Creb 表达对抑郁样行为的调控作用尚需进一步验证。

本研究通过 AAV 介导的 shRNA 敲低大鼠前额皮质 Creb 表达的模型,观察 Creb 表达的改变对大鼠行为学的影响,以探索 Creb 在前额皮质的表达与抑郁症发病的关系。通过脑立体定位注射将 AAV 注射至大鼠前额皮质,参考相关文献,于注射 4 周后观察病毒转染效率^[18]。通过 Western blot、免疫荧光和 RT-qPCR 检测发现与空载组比较,AAV-Creb1-shRNA2、AAV-Creb1-shRNA3 对大鼠前额皮质 Creb 的表达均有一定的敲低作用,shRNA1 组大鼠 Creb mRNA 表达量显著升高,其发生机制尚不明确,考虑可能 shRNA 干扰效率低,也不排除 shRNA 出现脱靶效应^[19],结合了其他非特异性上游基因,使 Creb mRNA 出现了显著升高。其中 AAV-Creb1-shRNA2 对 Creb 的敲低效果最为明显,因此将该 AAV 用于干扰前额皮质 Creb 表达的下一步实验。

临床上抑郁症患者多表现为食欲下降、体重下降、快感缺失、行为绝望和社交障碍等,因此在抑郁症动物模型评价时主要针对以上几个方面的改变进行评价^[20]。本研究结果显示,前额皮质注射 AAV-Creb1-shRNA2 联合束缚应激的大鼠体重和摄食量较单纯束缚应激的大鼠显著降低,其增长趋势也较缓慢,另外通过旷场实验、高架十字迷宫、强迫游泳和糖水试验监测结果显示,该组大鼠有更明显的绝望、恐惧、快感缺失和新环境探索欲下降等表现,而前额皮质注射 Creb1-AAV 大鼠体重和摄食量较单纯的束缚应激组有明显的改善,其绝望、恐惧、快感缺失、对新环境的探索欲下降等改变较束缚组和束缚干扰组均有明显的改善。以上研究结果表明前额皮质 Creb 表达降低可加重大鼠的抑郁情绪,而 Creb 表达升高则能在一定程度上缓解大鼠抑郁样行为。本研究结果也在另一先前研究中被进一步证实,如在利用 Cre/loxP 重组系统和他莫昔芬控制的基因操作手段诱导成年 C57BL/6J 小鼠海马神经元 CREB 的靶向消融后,可引起小鼠严重的焦虑和抑郁表型,表现为回避开放场地的中心位置和对新物体的探索欲望下降等行为,表明 CREB 蛋白的存在对情绪行为的调节至关重要^[21]。中枢神经递质水平异常是抑郁症的重要病理基础,5-HT 参与机体情绪波动、睡眠等过程,与抑郁症的发生密切相关^[22]。去肾上腺素(norepinephrine, NE)主要由交感节后神经元、NE 神经元等合成,其含量与机体情

绪密切联系^[23];发生抑郁症后 5-HT 和 NE 神经元兴奋性降低,导致 5-HT 和 NE 水平降低。CORT 是受 HPA 轴所影响的应激激素之一,CORT 水平过高,会引起认知功能异常和负面情绪^[24]。本研究还对大鼠前额皮质中 5-HT、NE 和 CORT 的含量进行了检测,与行为学指标协同以评价各组大鼠的抑郁状态。研究结果显示与束缚组比较,前额皮质注射 AAV-Creb1-shRNA2 的大鼠,其前额皮质 5-HT 和 NE 的含量显著降低,CORT 水平明显增加,而注射 AAV-Creb1 的大鼠,其前额皮质 5-HT 和 NE 的含量升高,CORT 水平降低,表明 Creb 干扰可调节上述神经递质水平从而加重大鼠的抑郁程度,而其表达增加可使大鼠抑郁程度减轻。众多同类研究也证实,例如在嗅球切除诱导的抑郁大鼠皮质和海马中皮质醇水平升高,而当 AKT/PKA-CREB-BDNF 信号通路被激活时,大鼠模型脑组织中皮质醇水平可降低^[25]。另外,在慢性不可预知轻度应激诱导的大鼠抑郁模型脑组织中 NE、5-HT 和 DA 的含量显著降低,而注射 miR-124 antagomir 后,Creb 表达增加,与此同时大鼠脑组织中 NE、5-HT 和 DA 的含量显著升高^[26]。本研究在基因干扰和高表达大鼠模型基础上进一步证实了前额皮质脑区 Creb 的表达与抑郁症的相关性,研究结果表明前额皮质 Creb 的表达是参与抑郁症发病的重要靶点之一,可为今后抑郁症动物基因模型构建及发病机制研究提供思路 and 参考。

参考文献:

- [1] LUPPA M, HEINRICH S, ANGERMEYER M C, et al. Cost-of-illness studies of depression: a systematic review [J]. J Affect Disord, 2007, 98(1/2): 29-43.
- [2] 蒋先仲, 李云峰, 张有志, 等. 抑郁症与脑内 CERB 的调节 [J]. 解放军药学报, 2007, 23(2): 127-129.
JIANG X Z, LI Y F, ZHANG Y Z, et al. Depression and regulation of CERB in brain [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army, 2007, 23(2): 127-129.
- [3] 王凌霄, 彭代辉, 方贻儒. CREB 在抑郁症发病和治疗作用中的研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(6): 647-650.
WANG L X, PENG D H, FANG Y R. Research progress of roles of CREB in pathogenesis and treatment of depression [J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci, 2010, 30(6): 647-650.
- [4] CARLEZON W A Jr, DUMAN R S, NESTLER E J. The many faces of CREB [J]. Trends Neurosci, 2005, 28(8): 436-445.
- [5] NIBUYA M, NESTLER E J, DUMAN R S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP

- response element binding protein (CREB) in rat hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(7): 2365–2372.
- [6] JEON S H, SEONG Y S, JUHN Y S, et al. Electroconvulsive shock increases the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein at Ser-133 in rat hippocampus but not in cerebellum [J]. *Neuropharmacology*, 1997, 36(3): 411–414.
- [7] THOME J, SAKAI N, SHIN K, et al. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 4030–4036.
- [8] NEWTON S S, THOME J, WALLACE T L, et al. Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(24): 10883–10890.
- [9] WALLACE T L, STELLITANO K E, NEVE R L, et al. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety [J]. *Biol Psychiatry*, 2004, 56(3): 151–160.
- [10] 刘燕, 邹小娟, 丁秀芳, 等. 基于复合应激的肝郁脾虚证小鼠模型的建立与评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(5): 1840–1844.
- LIU Y, ZOU X J, DING X F, et al. Establishment and evaluation of mouse models with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency based on multiple stresses [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(5): 1840–1844.
- [11] GASS P, RIVA M A. CREB, neurogenesis and depression [J]. *Bioessays*, 2007, 29(10): 957–961.
- [12] DWIVEDI Y, MONDAL A C, RIZAVI H S, et al. Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63(6): 639–648.
- [13] LI Y C, WANG F M, PAN Y, et al. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(3): 435–449.
- [14] WANG H, XU J, LAZAROVICI P, et al. cAMP response element-binding protein (CREB): a possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 255.
- [15] WANG G, ZHU Z, XU D, et al. Advances in understanding CREB signaling-mediated regulation of the pathogenesis and progression of epilepsy [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2020, 196: 106018.
- [16] YAO W, CAO Q, LUO S, et al. Microglial ERK-NRBP1-CREB-BDNF signaling in sustained antidepressant actions of (R)-ketamine [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(3): 1618–1629.
- [17] ZHANG T, WANG Y, YAO W, et al. Metformin antagonizes nickel-refining fumes-induced cell pyroptosis *via* Nrf2/GOLPH₃ pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 247: 114233.
- [18] ZHOU Q, FU X, XU J, et al. Hypothalamic warm-sensitive neurons require TRPC4 channel for detecting internal warmth and regulating body temperature in mice [J]. *Neuron*, 2023, 111(3): 387–404.
- [19] SINGH S, NARANG A S, MAHATO R I. Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(12): 2996–3015.
- [20] 刘燕, 彭梦薇, 刘高源, 等. 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(3): 36–44, 50.
- LIU Y, PENG M W, LIU G Y, et al. Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(3): 36–44, 50.
- [21] VOGT M A, INTA D, LUONI A, et al. Inducible forebrain-specific ablation of the transcription factor Creb during adulthood induces anxiety but no spatial/contextual learning deficits [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8: 407.
- [22] 杨杰, 易志凯, 李娜. 中老年首发抑郁症患者血清 VEGF、FGF-22 水平及相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(23): 5727–5729.
- YANG J, YI Z K, LI N. Serum VEGF and FGF-22 levels in middle-aged and elderly patients with first-episode depression and their correlation [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(23): 5727–5729.
- [23] 秦伟, 廖玲慧, 陈聪聪. 氟伐沙明对脑卒中后抑郁患者神经功能、负性情绪及单胺神经递质水平的影响 [J]. *国际精神病学杂志*, 2023, 50(3): 483–486.
- QIN W, LIAO L H, CHEN C C. Effects of fluvoxamine maleate on neurological function, negative emotions and monoamine neurotransmitter levels in post-ischemic stroke patients with depression [J]. *J Int Psychiatry*, 2023, 50(3): 483–486.
- [24] BONILLA-JAIME H, SÁNCHEZ-SALCEDO J A, ESTEVEZ-CABRERA M M, et al. Depression and pain: use of antidepressants [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(2): 384–402.
- [25] ZHAO C, WANG M, LI T, et al. Antidepressant-like effects of Jieyu Chufan capsules in the olfactory bulbectomy rat model [J]. *Brain Res*, 2024, 1824: 148676.
- [26] YANG W, LIU M, ZHANG Q, et al. Knockdown of miR-124 reduces depression-like behavior by targeting CREB1 and BDNF [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2020, 17(2): 196–203.