

以脑内神经递质失衡为特征的抑郁症 大鼠模型的改良研究

王东辉 潘彦舒 郭洋洋 郭 婕 程晓娜 韩振蕴

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:改良以脑内神经递质含量失衡为特征的抑郁症大鼠模型。方法:根据糖水消耗实验结果,把健康SD大鼠分成正常对照组、原模型组和改良模型组。改良模型组不安装套管,直接向左侧海马注射1 μL 浓度为8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的SCH23390,隔1天注射1次,共注射4次。原模型组通过套管,向左侧海马注射1 μL 浓度为2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的SCH23390,每注射2 d,休息1 d,反复3次,共注射6次。通过比较造模两周后大鼠体重和行为学(旷场试验、糖水消耗实验)差异,评价改良效果。比较大鼠两侧海马、大脑皮质内5-HT、5-HIAA、NE、DA、AChE含量变化,评价改良模型的病理特征。结果:成模两周后,与正常对照组比较,改良模型组、原模型组大鼠体重、旷场实验结果极显著下降($P < 0.01$),糖水偏爱率显著降低($P < 0.05$);同原模型组比较,改良模型组上述指标无统计学意义($P > 0.05$)。提示改良模型能够造成大鼠抑郁状态,且抑郁程度与原抑郁症模型相同。同正常对照组比较,改良模型组双侧海马5-HT、NE含量极显著增加,5-HIAA含量极显著降低($P < 0.01$);DA含量呈现下降趋势,AChE含量呈现增加趋势,但均没有统计学意义($P > 0.05$)。大脑皮质中,5-HT、NE、AChE含量呈现增加趋势,5-HIAA、DA含量呈下降趋势($P > 0.05$),表明改良模型基本符合抑郁症病理特征。结论:改良的造模方法为直接向左侧海马注射1 μL 浓度为8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的SCH23390,隔1天注射1次,共注射4次。经过有效性、病理特征观察,证明改良的模型方法有效,与原模型比较,不需要安装套管,减少了造模时间,且改良的模型可用于强迫游泳、水迷宫等实验,实现了改良的目的。

关键词 抑郁症;动物模型;行为学;神经递质;造模方法;改良;海马;大脑皮质

Improvement of the Depression Rat Model Based on the Unbalance of Neurotransmitters in the Brain

Wang Donghui, Pan Yanshu, Guo Yangyang, Guo Jie, Cheng Xiaona, Han Zhenyun

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To improve the depression rat model with neurotransmitters disorder within brain. **Methods:** According to the results of the sucrose consumption test, the healthy rats were randomly divided into normal control group, original model group and improved model group. Without installing the injection tube, the improved model group was injected SCH23390 into the left hippocampus every 2 days and 4 times in total, the dose was 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The original model group was placed the injection tube. Through the tube, SCH23390 was given into the left hippocampus at the dose of 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The medicine was given for 2 days, followed by a one-day rest, and 6 times totally. 2 weeks after the modeling, the improved effect was evaluated based on the difference of weight and behavior test (sucrose consumption and the open-field) of different groups. And the athological feature was observed by comparing the change of the content of the 5-HT, 5-HIAA, NE, DA and AChE in the left and right hippocampus, as well as in the cerebral cortical. **Results:** 2 weeks after modeling, the weight and the open-field results of the improved model group and the original model group significantly decreased compared to the normal control group ($P < 0.01$), and the sucrose-preference rate decreasing was also significant ($P < 0.05$). Compared with the original model group, the improved model group had no significant difference ($P > 0.05$). It demonstrated that the improved method could make the rats suffer from depression, and the impact was as same as the original. Compared with the normal control group, the level of 5-HT and NE increased significantly and 5-HIAA decreased significantly ($P < 0.01$) in the bilateral hippocampus. The decreasing of DA and the increasing of AChE had no statistical significance ($P > 0.05$). In the cerebral cortical, the content of 5-HT, NE and AChE increased, the content of 5-HIAA and DA decreased, the change was not statically significant ($P > 0.05$). It showed that the improved model group rates had the pathological features of the depression. **Conclusion:** The modified modeling approach of establishing the depression rat model was to inject the SCH23390 into the left hippocampus of the rat. The dose was 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and the frequency was once every 2 days and 4 times in total. By observation of validity and pathological features, the effectiveness of the improved approach was demonstrated. Furthermore, the modeling time was reduced by cancelling the procedure of the tube installation, and the model could be tested by the forced swimming test or the water maze, which achieved the goal of improvement.

Key Words Depression; Animal model; Behavior; Neurotransmitter; Modeling method; Improvement; Hippocampus; Cerebral cortex

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB518602)——基于心脑血管病变的脉络学说理论研究;国家自然科学基金面上项目(8167150452)——参知健脑方对血管性痴呆大鼠 clathrin 介导的 NMDA 受体胞吞过程的作用

作者简介:王东辉(1990.05—),男,硕士,研究方向:中医药防治抑郁症的基础研究,E-mail:wangdonghui1915@163.com

通信作者:潘彦舒(1972.12—),女,博士,教授,研究方向:脑病防治的中西医结合基础研究,E-mail:13911209998@163.com

中图分类号:R241 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.041

在前期的临床观察中,本团队发现抑郁症患者脑内的单胺类神经递质存在含量失衡的情况,表现为 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT) ↑、多巴胺(Dopamine, DA) ↓,乙酰胆碱(Acetylcholine, ACh) ↑、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE) ↓^[1]。据此临床现象,本团队建立了以脑内神质失衡为特征的抑郁症大鼠模型^[2]。原造模方法需要安装套管用以向左侧海马给药。套管安装后,注射多巴胺 D1 受体抑制剂 SCH23390,以打破双侧海马和大脑皮质内神经递质含量的平衡,药物的剂量为 2 μg/μL × 1 μL/d,每注射 2 d,休息 1 d,反复 3 次,共计给药 6 次。然而,安装给药用套管会增加造模时间,且不利于强迫游泳实验和水迷宫等实验的开展。所以,本实验希望去除套管的安装,提高给药剂量,减少给药次数,以优化造模过程,并观察改良模型的有效性和病理特征。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 26 只,体重 250 ~ 270 g,购买自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2014-0004]。饲养条件为:温度(22 ± 1)℃;湿度(47 ± 2)%;12 h 昼夜交替光照,自由进食进水。

1.1.2 试剂及仪器 SCH23390 (Sigma, 批号:125M4614V), 5-HT(上海阿拉丁,批号:S111161), DA(上海阿拉丁,批号:D103111), NE(上海阿拉丁,批号:D134211), 5-HIAA(上海阿拉丁,批号:H133485)。

68003 型脑立体定位仪(瑞沃德生命科技有限公司,深圳),78001 型颅骨钻(瑞沃德生命科技有限公司,深圳),API3200 型液质联用仪(Applied Biosystems), UltiMate3000 型高效液相色谱仪(Dionex), MULTISKANMK3 型全自动多功能酶标仪(Thermo)

1.2 方 法

1.2.1 分 组 与 模 型 制 备

1.2.1.1 大鼠采用单笼饲养 适应性饲养 1 周后,根据糖水消耗实验情况,将健康大鼠随机分组:正常对照组 9 只、原模型组 11 只、改良模型组 11 只。

1.2.1.2 模型的制备 第 1 次给药时用 10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,ip,后 3 次给药以乙醚吸入麻醉。将麻醉好的大鼠放置于带有微量注射器的脑立体定位仪上,依据 Paxinos 和 Watson 大鼠脑图谱

所示^[3],定位大鼠左半侧海马(AP-3 mm, L 1.8 mm, H 3 mm)。使用颅骨钻在颅骨相应位置打孔,缓慢将微量注射器插入所需深度,注射 SCH23390,剂量为 8 μg/μL × 1 μL/d,隔 1 d 给药 1 次,共给药 4 次。

1.2.1.3 原模型制备 1)安装给药用套管:原模型组以 10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,腹膜内给药,将麻醉好的大鼠放置于脑立体定位仪上,依据 Paxinos 和 Watson 大鼠脑图谱,定位左侧海马(AP-3 mm, L 1.8 mm, H 3 mm),使用颅骨钻在颅骨相应位置打孔,植入一微量注射用套管(直径 0.56 mm,长度 3.2 mm)和 2 枚配套螺丝,用牙托水、牙托粉固定。术后大鼠自由饮水饮食,连续 3 d 青霉素 2 × 10⁴ 单位,腹膜内给药,恢复 1 周后给药;2)给药:大鼠吸入乙醚麻醉,使用微量注射器,通过套管向海马注射 SCH23390,剂量为 2 μg/μL × 1 μL,每给药 2 d,休息 1 d,共给药 6 d。

1.2.2 检测指标与方法

1.2.2.1 体重及行为学测试 正常对照组不做处理,给药后两周进行体重及行为学测试。1)体重测定:于成模后第 14 天进行体重测定;2)糖水消耗实验:依据文献^[4]并加以调整,于成模后第 14 天进行糖水消耗实验,配制 1% 的蔗糖水,每只大鼠第 1 天给予 2 瓶蔗糖水,第 2 天给予 1 瓶蔗糖水和 1 瓶大鼠饮用水,第 3 天禁食禁水 24 h,24 h 后将 1 瓶重 200 g 的 1% 蔗糖水和 1 瓶重 200 g 的饮用水给予每只大鼠。于 12 h 后取走 2 种液体,并称量每瓶液体所剩质量,依据公式糖水偏爱率(%) = 糖水消耗/总液体消耗 × 100%,求得每只大鼠的糖水偏爱率。3)旷场实验^[5]:依据文献并加以调整,于成模后第 14 天进行,自制 1 个 100 cm × 100 cm × 40 cm 木箱,黑色,有底无盖,用白线将底部均匀划成 5 × 5 个方格。在安静、光线昏暗的环境下,将大鼠从同一位置、同一方向放置于木箱的中央,大鼠自由活动。计算 5 min 内大鼠活动的水平运动得分(大鼠四肢均穿过的方格数,若沿线行走,则以 20 cm 为 1 格)和垂直运动得分(两前肢完全抬离地面至少 1 cm 或攀爬箱壁至放下的次数)。在 2 只大鼠测试间歇,使用低浓度乙醇溶液擦拭敞箱,以防止上一只大鼠所留气味对其后大鼠的实验结果产生影响。

1.2.2.2 病理学检测 1)取材:大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,断头后,取出脑组

织,分离大脑皮质及左、右海马,装入离心管中,放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。2)HLPC-MS 测量皮层、左右海马中 5-HT、DA、NE、5-HIAA 含量:取组织,滴下生理盐水,匀浆。取匀浆液 $50\text{ }\mu\text{L}$,加入含有内标异丙肾上腺素的甲醇 $200\text{ }\mu\text{L}$,旋转 1 min 后, $13\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 4 min ,保证温度在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用。取上清液,备用。色谱条件:流动相:A 水相:水(0.1% 甲酸),B 有机相:乙腈(0.1% 甲酸),色谱柱:MSLab C18 ($150\times 4.6\text{ mm }5\text{ }\mu\text{m}$),柱温: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$,流速为 1 mL/min 。质谱条件:离子源,采用 +ESI 电喷雾离子源;喷雾电压为 $4\text{ }800\text{ V}$;雾化气为 50 psi ;辅助气为 60 psi ;碰撞气为 Medium;雾化温度为 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$;气帘气为 20 psi ;碰撞室射入电压:10,射出电压:2.0,扫描方式为 MRM 多反应监测。MRM (NE) = 170.1/152.1, MRM (DA) 154.1/137.1, MRM (5-HIAA) 192.06/146.06, MRM (5-HT) = 177.1/160.1, MRM(Is) = 271.03/156.01。

1.2.2.3 ELISA 法检测大脑皮质及双侧海马中 AchE 的含量,依据 ELISA 试剂盒手册测定。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示。若为 2 组数据比较,采用独立样本 t 检验或非参数检验;若为多组数据比较,采用 one-way Anova 或非参数检验;组间比较,采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重及行为学测定结果 造模 2 周后,同正常对照组比较,改良模型组糖水偏爱率显著降低($P < 0.05$),体重、旷场运动水平和垂直运动均极显著降低($P < 0.01$)。与原模型组比较,改良模型组糖水偏爱率、体重变化率、旷场试验水平和垂直运动得分差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 左侧海马神经递质及 AchE 含量 造模两周后,同正常对照组比较,改良模型组大鼠左侧海马 5-HT、NE 含量极显著升高($P < 0.01$);5-HIAA 含量极显著减少($P < 0.01$);DA 含量呈降低趋势,AchE 含量呈升高趋势,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 右侧海马神经递质及 AchE 含量 造模两周后,同正常对照组比较,改良模型组大鼠右侧海马 5-HT、NE 含量极显著升高($P < 0.01$);5-HIAA 含量极显著减少($P < 0.01$);DA 含量呈减少趋势,AchE 含量呈增加趋势,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 大脑皮质内神经递质及 AchE 含量 造模两周后,同正常对照组比较,改良模型组大鼠大脑皮质中 5-HT、NE、AchE 含量呈升高趋势;5-HIAA、DA 含量呈降低趋势($P > 0.05$)。见表 4。

表 1 各组大鼠体重及行为学变化($\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	糖水偏爱率(%)	水平运动(分)	垂直运动(分)
正常对照组($n=9$)	349.81 \pm 10.96	91.85 \pm 7.96	49 \pm 16.94	9.44 \pm 1.88
改良模型组($n=8$)	289.20 \pm 7.56 **	76.50 \pm 10.79 *	23.75 \pm 9.11 **	1.75 \pm 1.28 **
原模型组($n=8$)	293.14 \pm 10.05 **	78.53 \pm 4.56 *	26.12 \pm 11.86 **	1.38 \pm 1.6 **

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与正常对照组比较,* $P < 0.05$

表 2 左侧海马内神经递质及 AchE 含量变化($\bar{x} \pm s$,ng/g)

组别	5-HT	5-HIAA	DA	NE	AchE
正常对照组($n=9$)	2.68 \pm 1.03	532.69 \pm 77.44	8.62 \pm 2.49	1731.75 \pm 164.83	4130 \pm 790
改良模型组($n=8$)	4.47 \pm 0.75 **	416.71 \pm 48.21 **	7.86 \pm 1.55	1976 \pm 145.44 **	4550 \pm 1280

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$

表 3 右侧海马内神经递质及 AchE 含量变化($\bar{x} \pm s$,ng/g)

组别	5-HT	5-HIAA	DA	NE	AchE
正常对照组($n=9$)	2.29 \pm 0.74	691.32 \pm 105.7	10.71 \pm 2.18	1524.59 \pm 146.63	5170 \pm 970
改良模型组($n=8$)	5.26 \pm 0.76 **	498.77 \pm 62.88 **	9.17 \pm 1.69	1934.78 \pm 133.68 **	5900 \pm 830

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$

表 4 大脑皮质内神经递质及 AchE 含量变化($\bar{x} \pm s$,ng/g)

组别	5-HT	5-HIAA	DA	NE	AchE
正常对照组($n=9$)	2.74 \pm 0.74	611.26 \pm 122.27	14.22 \pm 2.92	1 101.49 \pm 139.26	570 \pm 140
改良模型组($n=8$)	3.14 \pm 1.23	566.23 \pm 48.86	14.17 \pm 1.3	1 129.32 \pm 242.43	630 \pm 120

3 讨论

抑郁症的动物模型有许多,主要可以分为手术模型、药物介导模型、应激模型和遗传模型等^[6]。这些模型已经被广泛应用于抑郁症的研究中,但每种模型都存在一定的缺陷,如:慢性轻度不可预见性应激(CUMS)模型造模时需要保障造模环境的一致性,且造模耗时长,增加了工作量;嗅球摧毁模型是创伤性模型,大鼠死亡率较其他模型较高,增加了实验成本;遗传模型不能完全模拟抑郁症的发病过程,且应用不广泛。因此,开发新的抑郁症模型对抑郁症的研究意义重大。

在之前的研究中,本团队根据在体检测临床抑郁症患者脑内神经递质的变化规律建立了一种新的抑郁模型,该模型以脑内神经递质失衡为主要特征,在行为学表现上也符合抑郁症的特征。但是在造模过程中需要安装套管,这延长了造模时间,且不利于水迷宫、强迫游泳实验的进行。所以,本实验取消了套管的安装,提高给药剂量、减少给药次数,以缩短造模用时。

改良的造模方法为向左侧海马注射 SCH23390,剂量为 $8 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 1 \mu\text{L}/\text{d}$,给药频率为隔 1 d 给药 1 次,共 4 次。改良模型造成的抑郁状态依据行为学评价^[7-8]。“快感缺失”是抑郁症的核心症状^[9],是指抑郁症患者体验快乐能力的下降。糖水消耗实验即是评估抑郁症动物模型的“快感缺失”情况^[10]。抑郁症患者自主活动减少,旷场实验通过观察动物在陌生环境下穿越格子数、抬爪次数评价动物模型自主活动和探索行为的改变。常用的抑郁模型,如 CUMS 模型、习得性无助模型,糖水偏爱率、旷场实验得分均下降^[11-12]。本实验中,改良模型的体重、糖水偏爱率、旷场实验水平及垂直运动得分均降低,表明改良的造模方法可以造成大鼠的抑郁状态。而同原模型比较,改良模型上述指标未有明显改变,表明改良模型、原模型所造成的抑郁程度相同。

经典的单胺递质假说认为抑郁症的发病与 5-HT、NE、DA 含量的改变有关^[13]。本实验结果显示左、右侧海马 5-HT、NE 含量极显著增加,5-HIAA 含量极显著减少,DA 含量呈降低趋势;大脑皮质内 5-HT、NE 含量呈增加趋势,5-HIAA 和 DA 含量呈降低趋势,这与王援朝^[14]的观察结果相一致或呈现相应趋势,也与原抑郁症模型的神经递质改变相同。

AchE 是 Ach 的水解酶,由于 Ach 性质不稳定,

所以经常通过观察 AchE 含量的改变反应 Ach 含量的变化。抑郁大鼠脑组织中 AchE 增加^[15],而本实验中 AchE 含量呈升高趋势,这与其他实验结果相符合。

综上所述,改良的造模方法能够造成大鼠抑郁状态,所造成的抑郁状态与原模型相同,但因其减少了造模时间、所造模型可以用于强迫游泳实验、或水迷宫实验,实现了对原模型改良的目的。

参考文献

- [1] 池名,青雪梅,潘彦舒,等. 120 例抑郁症患者大脑多神经递质变化初探[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1516-1524.
- [2] 程晓娜,潘彦舒. 基于脑内神经递质对的拮抗关系建立新型抑郁症大鼠模型的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2017,33(6):1141-6.
- [3] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1986.
- [4] 刘俊彤,李昱颖,景泉凯,等. 电针对慢性应激抑郁大鼠血 6 酮前列腺素 F12 α 、血栓素 B2、P-选择素水平的影响[J]. 环球中医药,2018,11(4):481-485.
- [5] 曹莉莎,叶云,罗文,等. 尼美舒利对慢性应激大鼠抑郁行为的影响[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(11):890-895.
- [6] 薛涛,郭丽莎,刘新民,等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展[J]. 中国实验动物学报,2015,23(3):321-326.
- [7] 马妮,陈林庆,蔺兴遥,等. 慢性应激抑郁症大鼠模型的复制与评价[J]. 甘肃中医学院学报,2010,27(6):7-10.
- [8] 汤球,刘志学,崔淑芳,等. 大鼠抑郁症模型的建立与评价[J]. 实验动物科学,2011,28(1):6-9.
- [9] 杨新华,刘小群,尹霞云,等. 抑郁症快感缺失:概念及其神经生物学基础[J]. 中国临床心理学杂志,2013,21(5):747-750.
- [10] 罕园园,代解杰. 抑郁症动物模型与其发病机制研究的进展[J]. 中国实验动物学报,2016,24(3):321-326.
- [11] Huiying Tan, Wei Zou, Jiamei Jiang, et al. Disturbance of hippocampal H₂S generation contributes to CUMS-induced depression-like behavior; involvement in endoplasmic reticulum stress of hippocampus[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015(4):285-291.
- [12] Jian Zonga, Xingzhi Liao, Bingxu Ren, et al. The antidepressant effects of rosiglitazone on rats with depression induced by neuropathic pain[J]. Life Sciences, 2018, 203:315-322.
- [13] 呼日乐巴根,佟海英,松林,等. 肉蔻-5 味丸对慢性抑郁模型大鼠行为及海马单胺递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):146-149.
- [14] 抑郁症精神分裂症强迫症脑电超慢涨落图分析[J]. 临床神经电生理学杂志,2006,15(3):182-183.
- [15] 周红伟,张惠实,朱宏飞,等. β -细辛醚对抑郁模型小鼠背侧纹状体中乙酰胆碱能受体介导多巴胺传输的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2017,46(4):420-425.