

· 基础研究 ·

5,7-DHT 诱导 5-HT 神经元毁损致小鼠抑郁表现

袁 华¹ 龙 华² 牟 翔¹ 李 玲¹ 刘 静¹ 葛雪松¹

摘要 目的:通过侧脑室注射 5-HT(5-羟色胺, 5-Hydroxytryptamine)类似物 5,7-DHT(5,7-双羟色胺, 5,7-dihydroxytryptamine), 毁损中缝背核的 5-HT 能神经元, 通过行为学评估研究其是否导致小鼠抑郁样症状, 探讨 5-HT 在抑郁发病机制中的作用。**方法:**C57BL/6J 小鼠经脑室注射 5,7-DHT 后 14 天, 观察体重变化, 并使用强制游泳实验、悬尾实验评估其是否出现抑郁症状, 并用免疫组织化学方法观察中缝背核 5-HT 神经元的残存情况。**结果:**侧脑中注射 5,7-DHT 后 14 天, 脑中中缝背核的 5-HT 能神经元几乎完全消失, 被 GFAP 阳性的星形胶质细胞所代替, 小鼠体重几乎不增加、强制游泳实验和悬尾实验中的“无动时间”均明显延长, 表现出明显的抑郁症状。**结论:**5,7-DHT 可以毁损 5-HT 神经元, 引起抑郁症状, 提示 5-HT 在抑郁症的发病机制中发挥着一定作用。

关键词 5-羟色胺; 5,7-双羟色胺; 抑郁

中图分类号: R493.R749 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2006)-02-0108-03

Depression induced by 5-HT depletion by 5,7-dihydroxytryptamine/YUAN Hua, LONG Hua, MOU Xiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(2):108-110

Abstract Objective: By I.C.V. 5, 7-dihydroxytryptamine (5, 7-DHT) injection to deplete DR 5-HT neurons and measuring the depression like behavior to observe the role of 5-HT in the etiology of depression.**Method:**C57BL/6J mice were depleted of brain serotonin using I.C.V. 5, 7-dihydroxytryptamine (5, 7-DHT) injection. The bodyweight were measured. The forced swimming test(FST) and the tail suspension test(TST) were used to detect the depressive like behavior and immunohistochemical staining used to observe the 5-HT neurons in the dorsal raphe(DR).**Result:** 5, 7-DHT effectively depleted the 5-HT neurons in DR. The mice treated with 5, 7-DHT showed obviously less increase of the bodyweight and markedly depressive like behavior in FST and TST in which the“immobility time”increased obviously.**Conclusion:**5,7-DHT can deplete 5-HT neurons and thus induce depression like behaviors which suggests that 5-HT plays a certain role in depression.

Author's address Dept. of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032

Key words 5-Hydroxytryptamine; 5, 7-dihydroxytryptamine; depression

卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)是一个比较常见的卒中后并发症, 国内外报道 PSD 的发病率的差异比较大, 大约在 20%—79%之间^[1], 可延缓神经功能和认知功能的恢复, 严重影响患者生存质量, 延长患者的康复时间, 造成极大的精神和经济负担。关于 PSD 发病机理和治疗的研究受到广泛的关注, 5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)在情绪、情感等高级功能中的作用, 被认为是抑郁症的发病机制中一个重要环节, 但是其具体的机制尚不清楚。本实验通过侧脑室注射 5,7-双羟色胺 (5,7-dihydroxytryptamine, 5,7-DHT) 选择性毁损小鼠脑中 5-HT 神经元观察其行为学变化, 旨在探讨 5-HT 在抑郁发病中的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组

C57BL/6J 小鼠, 周龄 10 周, 体重 20—21g, 日本纪和实验动物株式会社提供。置于安静、温暖、昼夜

明暗周期为 8:00—20:00 光照、20:00—次日 8:00 黑暗的实验室中, 自由饮水、摄食。饲养 1 周后, 随机分为毁损(5,7-DHT 注射)组、假手术(生理盐水注射)组和空白对照组(n=10)。

1.2 模型制作

毁损组和假手术组在手术前在腹腔注射 desipramine(25mg/kg)和 nomifensine(10mg/kg), 40min 后给予苯巴比妥钠(65mg/kg, i.p)腹腔麻醉后, 将动物固定在立体定位仪。按照以下位置(与 bregma 点距离): AP-0.7, ML±1.0 and V -1.7 (mm from dura), 用 10μl Hamilton 微量注射器进行双侧脑室注射。毁损组经脑室注射 5,7-DHT (Sigma, USA) 50μg, 溶解于含 0.1%柠檬酸的生理盐水。假手术组注射等量的含 0.1%柠檬酸的生理盐水。注射后留针 5min。

1 第四军医大学西京医院康复与理疗科, 710032

2 第四军医大学唐都医院骨科

作者简介:袁华,女,博士,主治医师

收稿日期:2005-08-26

空白对照组不接受注射, 各组每天经同一人轻柔抓取动物 5min。

1.3 行为学评估

1.3.1 体重测定: 每两日称量小鼠体重, 直至 14 天, 将体重增长绘制曲线, 另外计算各组 14 天与实验前比较体重增加的数值, 进行统计分析。

1.3.2 强制游泳实验: 参考 Porsolt 强制游泳实验将动物放入直径为 25cm, 高度为 40cm 的透明树脂玻璃水缸, 水深 15cm, 水温 25℃ 动物除了保持漂浮所需的必要的最小运动外肢体停止运动记为不动, 记录 6min 内的第 2—6min 的不动时间总和。

1.3.3 悬尾实验: 动物尾部远端 1.5cm 处固定后悬挂于 (40×40×40)cm³ 的白色树脂玻璃盒中, 距地面 15cm。无肢体挣扎运动记为不动, 记录 6min 内的第 2—6min 的不动时间总和。

1.4 统计学分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS11.0 统计软件包进行统计单因素 ANOVA 分析, 组间差异采用 Dunnett's post hoc test。

1.5 免疫组织化学染色

动物在存活 14 天后, 由过量苯巴比妥钠 (70mg/kg body weight, i.p.) 麻醉后, 用 15ml 0.01M PBS 和 50ml 4% 多聚甲醛灌注固定后, 立即取脑置于 20% 蔗糖溶液, 4℃ 过夜沉底后, 取全脑进行冰冻切片 (Cryostat; Leitz, Wetzal, Germany), 片厚 30μm, 隔 5 取 1 收集于 0.01 M PBS 中。

切片经封闭液 (PBS containing 1% Bovine serum, 5% NGS, 0.3% Triton X-100) 30min, 后分别浸入一抗: 兔抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (1:500, CHEMICON International Inc); 兔抗 5-HT 抗体 (1:5000, Sigma); 4℃ 孵育 24h, PBST 洗涤 3 次后入鼠抗 GFAP (1:1000, Sigma) 4℃ 孵育 24h, 经 PBST 洗涤 3 次后浸入混合荧光二抗 Alexa 546 goat anti rabbit IgG (1:1000, Molecular probes) 和 Alexa 538 goat anti mouse IgG (1:1000, Molecular probes) 中, 室温避光孵育 3h, 随后 PBST 洗涤后封片, 在激光共聚焦荧光显微镜 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) 下观察并采图。

2 结果

2.1 小鼠体重变化曲线

各组小鼠在实验前体重差异无显著性意义, 2 周后空白对照组与假手术组体重明显增加, 与造模前比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 而损毁组体重无明显增加, 与造模前比较差异无显著性意义

(表 1)。

组别	空白对照组	假手术组	损毁组
造模前	20.10±0.22	20.78±0.97	21.06±0.86
造模后 2 周	23.80±0.76 ^②	24.00±0.43 ^②	21.55±0.81

与造模前比较 ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$

2.2 强制游泳实验

强制游泳实验无动时间: 空白对照组为 35.72±7.32s, 假手术组为 32.00±11.2s, 损毁组为 883.50±35.03s, 损毁组与空白对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.3 悬尾实验

小鼠悬尾实验无动时间: 空白对照组为 119.76±11.96s, 假手术组为 67.36±16.30s, 损毁组为 160.99±20.24s, 损毁组与空白对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.4 免疫组织化学染色

手术前, 5-HT 免疫组织化学染色显示在 DR 部位, 主要是 5-HT 染色阳性的神经元胞体分布; 而 5,7-DHT 注射后 14 天, DR 中几乎看不见 5-HT 阳性的神经元, 剩余少量浓缩的圆形或不规则样阳性染色, 考虑为凋亡或坏死的神经元。GFAP 免疫组化染色显示在原来被 5-HT 阳性神经元占据的地方被大量的 GFAP 染色阳性的星形胶质细胞所代替。其中可见许多 GFAP 阳性的星形胶质细胞突起增粗、扭曲 (图 1A—C)。

在黑质 (SNC) 的 DA 能神经元和蓝斑 (LC) 的 NE 能神经元, 可以被 TH 免疫组化染色所显示。本实验中, 手术前和手术后 14 天, 在 SNC 和 LC 的 TH 阳性神经元的形态和数目均没有明显改变。(图 1D—E)。

3 讨论

约有 17% 的人群在一生中经历过抑郁, 抑郁带来巨大的社会和经济负担。关于 PSD 的研究开始于上个世纪 70 年代, 但是关于抑郁的研究尚有很多争议^[2]。关于抑郁的发病机制有多种理论, 其中, 开始于上个世纪 60 年代的“单胺递质”假说至今仍然被广泛接受, 但是其引起抑郁的具体机制仍然不清楚。有大量证据显示抑郁症状与 5-HT 减少有关, 选择性 5-HT 重摄取抑制剂 (SSRI) 类抗抑郁药物被认为是选择性结合于 5-HT 转运体, 阻断 5-HT 的重摄取, 从而增加突触中的 5-HT 含量^[3]。

5-HT 产生于中缝背核和正中核 (dorsal and medial raphe nucle), 支配大部分前脑结构。5-HT 在很多行为中: 如活动节律、摄食、性行为和情感状

A 术前 DR 的 5-HT 阳性神经元 B 术后 14 天 DR 中几乎没有 5-HT 阳性神经元 C 术后 14 天 GFAP 阳性的星形胶质细胞 D、E 在 SNC 中的 DA 能神经元和 LC 中的 NE 能神经元形态和数目均无明显变化

图 1 5,7-DHT 脑室注射前后中缝背核的免疫组化染色

态中发挥作用^[4-5]。5-HT 转运体通过转移细胞外液的 5-HT 来调节其传递。选择性 5-HT 阻断剂 5,7-DHT 被广泛用于 5-HT 系统的损毁^[6-7]。在本实验中 5-HT 免疫组化染色显示在 DR 中的 5-HT 神经元几乎完全消失, 而假手术组 DR 中的 5-HT 神经元的形态和数目与空白对照组没有差异。

在注射前用 desipramine 和 nomifensine 预处理是为了预防 5,7-DHT 对 DA 能和 NE 能神经元的损伤作用^[8], TH 免疫组化染色显示损毁组、假手术组在 SNC 和 LC 的 DA 能和 NE 能神经元形态和数目均未受到影响, 提示本实验中所用剂量起到了有效的保护作用, 5,7-DHT 只对 5-HT 能神经元起特异性的损毁作用。

观察比较各组的体重变化时, 5-HT 损毁组在手术后存活 14 天, 体重几乎没有增加; 而空白对照组平均增加了 3.7g, 假手术组平均增加了 3.22g, 均与实验前有显著差别。在抑郁患者中通常可以发现明显的食欲下降和体重减轻^[9], 这可能与 5-HT 的减少有关, 本实验模型重复出这一表现。

强制游泳实验和悬尾实验是最常用的评估动物抑郁表现的两种行为学评估手段。普遍认为“抑郁”的动物在遭遇新的刺激时往往表现比较迟钝, 面临危险时, 挣扎减少, 在强制游泳实验中表现为在水面静止、浮漂的时间增加; 在悬尾实验中上下挣扎的时间和挣扎幅度减少^[9]。通过传感器记录动物运动的幅度和时间, 在各组间进行比较发现, 假手术组和空白对照组之间的“无动时间”没有差异, 而将 5-HT 神经元损毁后强制游泳实验和悬尾实验中的“无动时间”均显著增加, 表现出“抑郁”症状。本实验结果显示神经毒性诱导的 5-HT 能神经元损毁可以诱导典型的抑郁表现。

在 DR 的双标免疫组化显示在空白对照组和假手术组, DR 中细胞成分除绝大部分神经元外, 只有少量的 GFAP 阳性的星形胶质细胞, 突起纤细、光滑。而 5,7-DHT 注射后 14 天, DR 中的 5-HT 神经元完全消失, 被 GFAP 染色阳性的星形胶质细胞, 细

胞肥大, 突起粗大、扭曲。一方面这是神经元损伤后星形胶质细胞的一种保护性反应, 另一方面, 近几十年, 星形胶质细胞的功能受到广泛的重视, 星形胶质细胞不仅具有支持、营养、保护和充填损失空间的作用, 星形胶质细胞具有释放多种信息物质, 自身具有电活动, 能调节神经元的生长, 信号传递活动。近年来的研究认为胶质细胞在抑郁症的发病和治疗中也承担重要角色。并与神经元能进行信息交流^[10], 其在抑郁中的作用也逐渐被关注。

因此, 脑室注射 5,7-DHT 选择性损毁 DR 中的 5-HT 神经元可以诱导明显的抑郁样症状, 这个模型可以用于探讨 5-HT 在抑郁症发病中的作用。

参考文献

- [1] Aben I, Verhey F, Honig A. Research into the specificity of depression after stroke: a review on an unresolved issue [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2001, 25(4):671.
- [2] 周盛年, 于会艳, 刘黎青, 等. 脑卒中后抑郁 [J]. *临床神经病学杂志*, 2004, 17(2):154.
- [3] Kampf-Sherf O, Zlotogorski Z, Gilboa A, et al. Neuropsychological functioning in major depression and responsiveness to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants [J]. *J Affect Disord*, 2004, 82(3):453.
- [4] Hindmarch I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods [J]. *Eur Psychiatry*, 2002, Suppl 3:294.
- [5] Andrade TG, Nakamuta JS, Avanzi V, et al. Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT_{1A} receptors [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 163(1):18.
- [6] Muscat L, Tischler RC, Morin LP. Morin. Functional analysis of the role of the median raphe as a regulator of hamster circadian system sensitivity to light [J]. *Brain Res*, 2005, 1044(1):59.
- [7] Mogensen J, Wortwein G, Plenge P, et al. Serotonin, locomotion, exploration, and place recall in the rat [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75(2):381.
- [8] Cassaday HJ, Norman C, Shilliam CS, et al. Intraventricular 5,7-dihydroxyptamine lesions disrupt acquisition of working memory task rules but not performance once learned [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(1):147.
- [9] JF Cryan, C Mombereau. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice [J]. *Molecular Psychiatry*, 2004, 9(4):326.
- [10] Webster MJ, Grady JO', Kleinman JE, et al. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia [J]. *Neuroscience*, 2005, 133(2):453.