

雌激素对雌鼠抑郁样行为和海马 BDNF 表达的影响

刘晶¹ 吴敏² 孟凡涛¹ 代娟娟³ 刘翠兰¹ 胡凤爱¹ 李晨¹

摘要 目的 检测雌鼠不同性周期时的抑郁样行为、海马脑源性神经营养因子(BDNF)的表达量及雌激素剥夺和补加对抑郁样行为和 BDNF 表达的影响,阐明雌激素对抑郁症发病和治疗的调控作用。方法 雌性 C57 小鼠利用阴道涂片染色法区分为发情前期和发情间期组,采用强迫游泳行为评价两组雌鼠的抑郁样行为,并通过 Real-time PCR 和 Western blot 方法检测 2 组小鼠海马中总 BDNF mRNA 和蛋白表达水平。运用糖水偏好方法检测基础条件下和慢性不可预知应激(CUS)条件下卵巢摘除(OVX)后雌鼠的抑郁样行为。最后在 CUS 条件下,利用糖水偏好、强迫游泳及 Real-time PCR 方法分别检测雌激素补加对雌激素剥夺所诱导的抑郁样行为和海马中总 BDNF mRNA 表达的影响。结果 强迫游泳行为结果显示发情间期雌鼠不动时间高于发情前期($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示发情间期海马中总 BDNF mRNA 和蛋白的表达量比发情前期显著降低($P < 0.05$)。糖水偏好结果显示:基础条件下,与假手术组相比,卵巢摘除组糖水偏好值没有变化($P > 0.05$),CUS 条件下,糖水偏好值降低($P < 0.05$)。糖水偏好和强迫游泳结果显示外源性补加雌激素能翻转 CUS 条件下 OVX 所诱导的糖水偏好值的降低和不动时间的增加。实时荧光定量 PCR 结果显示:与假手术组相比,OVX 后海马 BDNF 总 mRNA 水平降低($P < 0.05$),而外源性补加雌激素后海马 BDNF 总 mRNA 水平恢复($P < 0.05$)。结论 雌鼠性周期能影响抑郁样行为和海马 BDNF 的表达,雌激素缺失能增加小鼠对 CUS 诱导的抑郁样行为的易感性;而外源性雌激素补加能翻转 CUS 条件下 OVX 所诱导的抑郁样行为和海马 BDNF mRNA 表达的降低。

关键词 慢性不可预知应激;抑郁样行为;雌激素;海马;脑源性神经营养因子

中图分类号 R 749

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1400-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.016

2019-10-29 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81601189);山东省自然科学基金资助项目(编号:ZR2018PH016、ZR2014HQ080、ZR2017PH028)

作者单位:滨州医学院附属医院¹ 代谢与神经精神疾病研究所、² 神经外科、³ 肿瘤研究实验室 滨州 256603

作者简介:刘晶,女,助教;

李晨,男,讲师,责任作者, E-mail: lc_0625@163.com

抑郁症是一种严重的精神疾病。女性较男性而言抑郁症患病率升高^[1]。研究^[2]报道女性一生都会经历雌激素水平的剧烈波动,而这些变化都与抑郁相关,这表明卵巢激素可能在女性的压力敏感性中发挥关键作用。卵巢激素可以在无压力的情况下对应激提供保护作用^[3],而在应激压力下,卵巢激素则能增加压力敏感性^[4]。多项报道^[5-6]表明,雌激素替代疗法在临床和动物实验研究中均可产生抗抑郁作用。研究^[7-9]报道前额叶皮层和海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在抑郁症发病和抗抑郁药物治疗中起着重要作用。研究^[10-11]报道海马脑区 BDNF 的表达量随着性周期的变化而变化,但是其作用结果还存在差异。该研究利用雌激素补加的方法验证雌激素对 BDNF mRNA 的调节作用。该实验为研究抑郁症发病和治疗的性别差异机制提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60 只 SPF 级 C57BL/6 雌鼠(体重 20~25 g,10 周龄)购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[生产许可证号:SCXK(鲁)20140007],自由饮水和饮食,环境温度 19~22℃,相对湿度 40%~60%,实验过程中动物的处置均符合滨州医学院附属医院动物伦理委员会的标准。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒购于广州 Omega 公司;RNA 反转录试剂盒购于大连 Takara 公司;RIPA 裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司;AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;雌激素(17 β -Estradiol)和溶剂 Sesame oil 购于上海 sigma 公司;兔抗 BDNF 抗体购于英国 abcam 公司;鼠抗 β -actin 单克隆抗体(1 mg/ml)购于美国 cell signaling technology 公司;羊抗鼠二抗 IR Dye800CW(1 mg/ml)和羊抗鼠二抗 IR Dye680 LT(1 mg/ml)均购于美国 Li-COR 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤及分组 实验①:20 只 C57BL/6

雌鼠随机均分为2组,分别用瑞氏染色法连续测定小鼠性周期8 d(2个完整性周期),第9天测定具体性周期后,测雌鼠强迫游泳抑郁样行为,小鼠断头后取组织。实验②:16只C57BL/6雌鼠随机均分为2组,1组为假手术组,1组为卵巢摘除组。手术2周后,先测定基础条件下糖水偏好抑郁样行为,给予小鼠3-day慢性不可预知应激(3 day chronic unpredictable stress, 3 d CUS),再测定糖水偏好抑郁样行为。实验③:21只C57BL/6雌鼠随机均分为3组,一组为假手术组,第二组为卵巢摘除组,第三组也为卵巢摘除组;手术2周后第一组背部皮下注射溶剂对照 Sesame oil,第二组背部皮下注射溶剂对照 Sesame oil,第三组背部皮下注射 17β -Estradiol(10 mg/kg),连续3 d,同时给予3组小鼠3 d CUS,最后一次注射完成后测定小鼠糖水偏好和强迫游泳行为,然后小鼠断头取组织。

1.2.2 动物模型制备 采用400 mg/kg水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,小鼠采用仰卧位,手术部位采用碘伏消毒,在脐与耻骨前缘中点处沿腹底壁正中切口切开皮层1~2 cm,沿皱襞切开腹白线及腹膜进入腹腔,在切口下方找到子宫体及一侧子宫角,沿子宫角向前导出卵巢后摘除卵巢,同法摘除另侧卵巢;将子宫复位后关腹,缝合完毕后皮下注射青霉素,预防感染。在术中及术后注意小鼠保温。其中为摘除卵巢的手术小鼠作为假手术对照。

1.2.3 瑞氏染色法测定小鼠性周期 小鼠阴道涂片自然干燥后滴加瑞氏染剂数滴,放置湿盒中静置1 min;加相当于染液1.5倍的磷酸盐缓冲液与染液混匀,保持约10 min;流水冲洗,干燥,封片,镜检。

1.2.4 3 d CUS 慢性应激步骤 参考已发表文章^[12]的方法,每天上下午给予以下刺激中的任何一种,持续3 d:束缚2、24 h光照、电击10 min(0.3 mA电击2 s,间歇16 s,共10 min)、夹尾15 min、高台30 min、24 h湿盒。

1.2.5 糖水偏好试验 测定前剥夺饮水4 h,2个相同的水瓶分别放置鼠笼的两侧,水瓶内分别装有1%蔗糖水与饮用水,测定12 h内小鼠糖水和水的消耗量,糖水偏好用糖水溶液消耗量所占总液体消耗量的百分比来表示。

1.2.6 强迫游泳试验 小鼠置于透明树脂水桶中(高度30 cm,直径10 cm),往圆筒中注入深度为15 cm,温度为24℃的自来水,强迫游泳6 min,记录小鼠后4 min内静止不动的时间。小鼠在水面漂浮,仅有为保持呼吸和保持头部在水面上的轻微运动状

态定义为静止不动。

1.2.7 RNA提取和 Real-time PCR 利用RNA提取试剂盒提取海马总RNA, RNA反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,然后用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行荧光定量PCR反应,20 μ l反应体系,具体反应条件:95℃ 5 min,95℃ 10 s,60℃ 30 s,40个循环,并建立溶解曲线。引物序列如下:总BDNF mRNA:上游引物:5'-GCCG-CCATGAAAGAAGTAAA-3',下游引物:5'-TCGT-CAGACCTCTCGAACCT-3';Actin:上游引物:5'-GAT-CATTGCTCCTCCTGAGC-3',下游引物:5'-ACTCCT-GCTTGCTGATCCAC-3'。

1.2.8 Western blot 小鼠经断头并在冰上迅速分离海马,置液氮中速冻,-80℃保存备用。取出海马并经RIPA裂解液裂解,经BCA法测定蛋白浓度,样品经SDS-PAGE胶分离,转印到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭,加入兔抗BDNF(1:1 000)和鼠抗 β -actin一抗(1:1 000)过夜孵育,加入羊抗鼠二抗IR Dye800CW或羊抗鼠二抗IR Dye680 LT荧光二抗(1:5 000)孵育1 h,经双红外激光成像系统成像并识别灰度进行分析。

1.3 统计学处理 实验数据采用 Graphpad Prism 7.0 统计软件进行数据统计分析并做图。利用 Shapiro-Wilk 检验验证各组数据的正态分布情况。各组数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 unpaired-T 检验。3组之间进行 one way ANOVA 方差分析,并利用 Turkey 进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌鼠不同性周期抑郁样行为 雌性小鼠进行阴道涂片检查,镜检结果显示:小鼠处于发情前期时,阴道分泌物中有大的、圆的、有核上皮细胞。小鼠处于发情间期时,阴道分泌物有大量小的白细胞,少量有核上皮细胞和角质化上皮细胞(图1A)。2 h后进行强迫游泳行为测定,结果显示发情间期时小鼠的不动时间多于发情前期($t = 2.43, P < 0.05$)(图1B)。

2.2 雌鼠发情前期和间期海马 BDNF mRNA 和蛋白表达量 BDNF mRNA 检测结果显示,与发情前期组相比,发情间期组雌鼠 BDNF mRNA 表达量降低($t = 3.96, P < 0.05$)(图2A)。BDNF 蛋白 Western blot 和数据统计分析结果显示(图2B),发情间期组 BDNF 蛋白表达量低于发情前期($P < 0.05, t =$

3.04)。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布 ($P < 0.05$)。

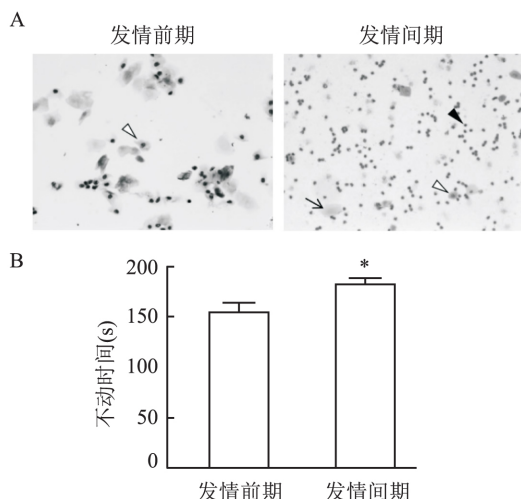


图1 雌鼠发情前期和间期阴道涂片

瑞氏染色图和强迫游泳实验结果 $\times 200$

A: 阴道涂片瑞氏染色图(空心三角形:有核上皮细胞;实心三角形:白细胞;黑色:无核鳞状上皮细胞); B: 强迫游泳实验;与发情前期比较: * $P < 0.05$

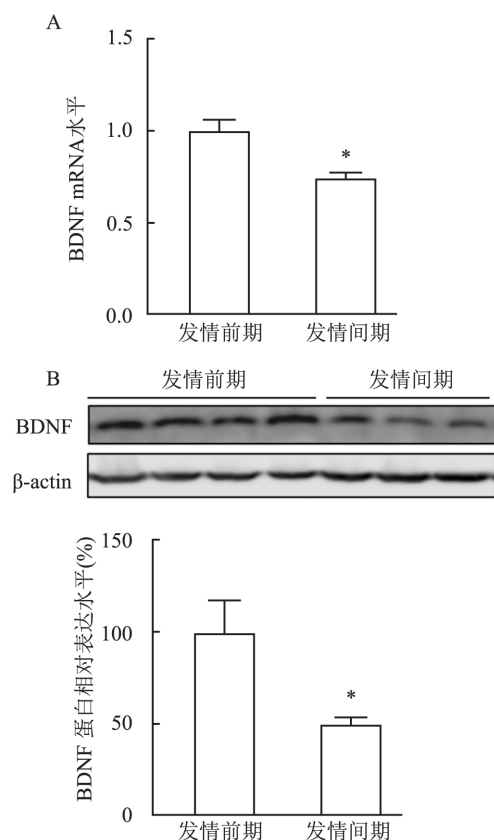


图2 雌鼠发情前期和间期海马 BDNF mRNA 和蛋白表达水平

A: BDNF mRNA 水平; B: BDNF 蛋白水平 Western blot 检测;与发情前期比较: * $P < 0.05$

2.3 雌激素剥夺后对雌鼠抑郁样行为和应激易感性的影响 糖水偏好行为结果显示:在基础条件下,

与假手术组相比,雌激素剥夺后(卵巢摘除)糖水偏好值没有变化($t = 0.75$, $P > 0.05$) (图3A)。然后,给予小鼠 3 d CUS,与假手术组相比,雌激素剥夺后糖水偏好值下降($t = 3.60$, $P < 0.05$) (图3B)。

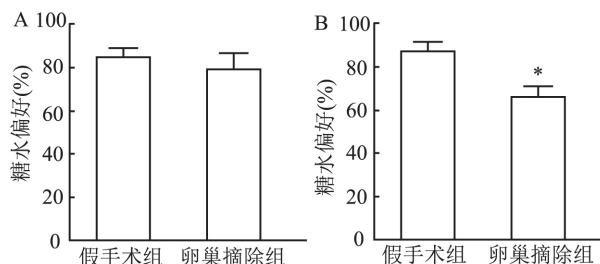


图3 雌激素剥夺后基础和应激条件下糖水偏好结果

A: 无应激条件下糖水偏好值; B: 应激条件下糖水偏好值;与假手术组比较: * $P < 0.05$

2.4 雌激素对应激状态下雌激素剥夺诱导的抑郁样行为的翻转作用 应激状态下雌激素剥夺和雌激素补加对糖水偏好值有影响 ($F = 5.57$, $P < 0.05$) (图4A),进一步比较分析结果显示与假手术组相比,应激状态下雌激素剥夺能降低糖水偏好值($P < 0.05$),而雌激素外源性补加能恢复糖水偏好值的降低($P < 0.05$) (图4A)。应激状态下雌激素剥夺和雌激素补加对糖水偏好值有影响 ($F = 6.38$, $P < 0.01$) (图4B),进一步比较分析结果显示与假手术组相比,应激状态下雌激素剥夺能增加不动时间($P < 0.05$),而雌激素外源性补加能恢复不动时间的增加($P < 0.05$) (图4B)。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布($P > 0.05$)。

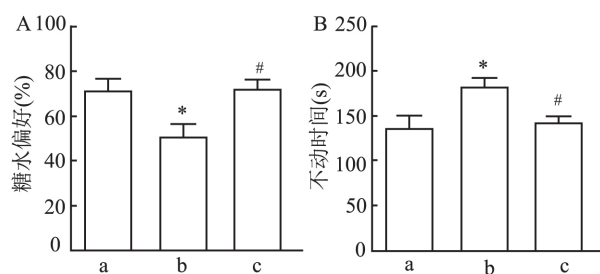


图4 应激状态下雌激素剥夺和补加对抑郁性行为的影响

A: 糖水偏好; B: 强迫游泳; a: 假手术 + 溶剂对照组; b: 卵巢摘除 + 溶剂对照组; c: 卵巢摘除 + 雌激素注射组;与假手术 + 溶剂对照组比较: * $P < 0.05$;与卵巢摘除 + 溶剂对照组比较: # $P < 0.05$

2.5 应激状态下雌激素剥夺和补加对海马 BDNF mRNA 表达的影响 OVX 14 d 后和雌激素补加对海马 BDNF mRNA 的表达有影响 ($F = 5.12$, $P < 0.05$) (图5),进一步比较分析结果显示与假手术组相比,OVX 能降低海马 BDNF mRNA 的表达($P <$

0.05), 而雌激素外源性补充能恢复海马 BDNF mRNA 表达的降低 ($P < 0.05$) (图 5)。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布 ($P > 0.05$)。

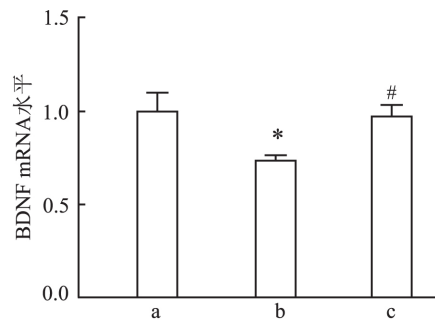


图 5 应激状态下雌激素剥夺和补充对海马 BDNF mRNA 表达的影响

a: 假手术 + 溶剂对照组; b: 卵巢摘除 + 溶剂对照组; c: 卵巢摘除 + 雌激素注射组; 与假手术 + 溶剂对照组比较: * $P < 0.05$; 与卵巢摘除 + 溶剂对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

大量临床和临床前研究表明绝经期女性或雌性罹患抑郁症的概率明显增加,人们普遍认为在很大程度上是由于性腺激素的变化所造成^[13]。在雌雄性腺所分泌的激素中,雌激素是其中较为重要的一种。雌激素水平的剧烈变化,如发生在手术和(或)自然绝经期,与焦虑和抑郁的发生率和症状学的变化有关^[13]。文献^[14]报道处于发情周期中雌激素水平较低的发情间期的大鼠在强迫游泳行为中表现出抑郁样行为,但是其具体机制尚不清楚,本研究表明小鼠发情周期中雌激素水平较低的发情间期海马 BDNF 的表达量明显低于雌激素水平较高的发情前期,而 BDNF 作为一种重要的神经营养因子,在抑郁症的发病机制和抗抑郁治疗中起重要作用,因此 BDNF 随着发情周期的变化而发生的变化可能是不同发情周期抑郁样行为的原因。与男性相比,大多数类型的抑郁症和焦虑症在女性中发病率更高,这种对压力产生的心理和生理后果的敏感性在青春开始时增强,并一直持续到更年期,这表明卵巢激素可能在女性的这种增强的压力敏感性中发挥了关键作用^[1]。有研究^[15]表明雌激素的缺乏能降低大鼠在对应激条件下中央杏仁核的敏感的细胞因子和肾上腺素反应。本研究表明 OVX 小鼠在基础条件下糖水偏好实验未表现出抑郁样表型,说明雌激素在无压力的情况对抑郁行为没有影响,但是如果给予 OVX 小鼠 CUS 刺激,OVX 小鼠的则表现出抑郁样表型,说明雌激素的缺乏介导了对应激诱导的抑郁

行为的易感性。大量研究^[16]报道雌激素能调控海马脑区 BDNF 的表达,但是都存在 BDNF 检测方法特异性和准确性不完善的缺陷,以及雌激素给药方式复杂和耗时的缺点,本文利用 OVX 和雌激素皮下注射方式结合行为学和 Real-time PCR 方法进一步确认雌激素缺乏在应激条件下能导致抑郁样行为和海马 BDNF mRNA 表达的降低,而雌激素外源性补充则能翻转抑郁样行为和拯救 BDNF mRNA 表达的降低。目前雌激素调控 BDNF mRNA 表达的机制尚不清楚,其中雌激素受体 β 作为一种核受体可能通过修饰 BDNF 启动子调控 BDNF mRNA 的转录^[17]。

参考文献

- [1] Schuch J J, Roest A M, Nolen W A, et al. Gender differences in major depressive disorder: results from the Netherlands study of depression and anxiety [J]. *J Affect Disord* 2014, 156: 156–63.
- [2] Albert K M, Newhouse P A. Estrogen, Stress, and Depression: Cognitive and Biological Interactions [J]. *Annu Rev Clin Psychol*, 2019, 15: 399–423.
- [3] Li L H, Wang Z C, Yu J, et al. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats [J]. *PLoS one* 2014, 9(4): e94312.
- [4] LaPlant Q, Chakravarty S, Vialou V, et al. Role of nuclear factor κ B in ovarian hormone-mediated stress hypersensitivity in female mice [J]. *Biol Psychiatry* 2009, 65(10): 874–80.
- [5] Studd J W. A guide to the treatment of depression in women by estrogens [J]. *Climacteric*, 2011, 14(6): 637–42.
- [6] Kiss A, Delattre A M, Pereira S I, et al. 17 β -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas [J]. *Behav Brain Res* 2012, 227(1): 100–8.
- [7] Seo M K, Ly N N, Lee C H, et al. Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus [J]. *Neuropharmacology* 2016, 105: 388–97.
- [8] Zheng Y, Fan W, Zhang X, et al. Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus [J]. *Epigenetics* 2016, 11(2): 150–62.
- [9] Duclot F, Kabbaj M. Epigenetic mechanisms underlying the role of brain-derived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants [J]. *J Exp Biol* 2015, 218(Pt 1): 21–31.
- [10] Scharfman H E, Hintz T M, Gomez J, et al. Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge [J]. *Eur J Neurosci* 2007, 26(9): 2595–612.
- [11] Fortress A M, Kim J, Poole R L, et al. 17 β -Estradiol regulates histone alterations associated with memory consolidation and increases Bdnf promoter acetylation in middle-aged female mice [J].

- Learn Mem 2014 21(9):457–67.
- [12] Lei Y, Wang J, Wang D, et al. SIRT1 in forebrain excitatory neurons produces sexually dimorphic effects on depression-related behaviors and modulates neuronal excitability and synaptic transmission in the medial prefrontal cortex[J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(5):1094–111.
- [13] Piccinelli M, Wilkinson G. Gender differences in depression: critical review[J]. *Br J Psychiatry* 2000, 177(6):486–92.
- [14] Walf A A, Frye C A. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31(6):1097–111.
- [15] Finnell J E, Muniz B L, Padi A R, et al. Essential role of ovarian hormones in susceptibility to the consequences of witnessing social defeat in female rats[J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 84(5):372–82.
- [16] Wei S-M, Berman K F. Ovarian hormones, genes, and the brain: the case of estradiol and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(1):223.
- [17] Chhibber A, Woody S K, Rumi M K, et al. Estrogen receptor β deficiency impairs BDNF – 5-HT2A signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression[J]. *Psychoneuroendocrinology* 2017 82:107–16.

Effects of estrogen on hippocampal BDNF expression and depression-like behaviors

Liu Jing¹, Wu Min², Meng Fan-tao¹, et al

(¹The Institute for Metabolic and Neuropsychiatric Disorders,

²Neurosurgery Bin Zhou Medical University Hospital, Binzhou 256603)

Abstract Objective To investigate the depressive-like behavior and expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in different sexual cycles of female mice and the effect of estrogen deprivation and supplementation on depressive-like behaviors and BDNF expression, and to elucidate the role of estrogen in the pathogenesis and therapy of depression. **Methods** Female C57 mice were screened for proestrus and diestrus by using vaginal smear staining. The forced swim was used to evaluate the depressive-like behavior of these two groups of female mice. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression levels of total BDNF mRNA and protein in the hippocampus of these two groups. Sucrose preference test was used to examine the depressive-like behaviors of female mice after OVX mediated estrogen deprivation under basal and chronic unpredictable stress condition. The effect of estrogen deprivation and supplementation on depression-like behaviors and hippocampal total BDNF mRNA expression of female mice were detected by sucrose preference test, forced swim test and Real-time PCR under stress condition respectively. **Results** The forced swim test results showed that the immobility time of diestrus was significantly more than that of proestrus ($P < 0.05$). Real-time PCR and Western blot results showed that the total mRNA and protein expression levels of hippocampal BDNF in the diestrus were significantly lower than those in the proestrus (all $P < 0.05$). The sucrose preference results showed that under the basic condition, the sucrose preference of OVX mice was not significantly changed compared with the sham operation control group ($P > 0.05$), under stress condition, the sucrose preference of OVX mice was significantly reduced ($P < 0.05$). Sucrose preference test and forced swim test results showed that estrogen supplementation could significantly reverse the decreased sucrose preference and increased immobility time induced by estrogen deprivation under the stress condition. Real-time PCR results showed that total BDNF mRNA level in the hippocampus of female OVX mice was significantly reduced ($P < 0.05$) compared to the sham operation group. However, the total mRNA level of hippocampal BDNF was significantly restored after exogenous estrogen supplementation ($P < 0.05$). **Conclusion** Sexual cycles of female mice can affect depression-like behavior and hippocampal total BDNF mRNA expression significantly, estrogen deprivation can enhance the susceptibility to the CUS induced depression-like behaviors, and estrogen supplementation can reverse the depression-like behavior and reduce hippocampal BDNF expression.

Key words CUS; depression; estrogen; hippocampus; brain-derived neurotrophic factor