

慢性不可预知应激所致抑郁小鼠 中缝背核脑区 BDNF 表达的变化

孟凡涛¹, 刘 晶¹, 王文涛¹, 代娟娟², 游晶晶¹, 胡凤爱¹, 李 晨¹

摘要 目的 检测脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA和蛋白在慢性不可预知应激(CUS)小鼠中缝背核脑区的表达情况。方法 将20只C57小鼠随机分为对照组(Control $n=10$)和CUS组($n=10$)两组,CUS组给予21 d应激,对照组每天抓取1次。分别采用糖水偏好实验(SPT)和强迫游泳实验(FST)对2组小鼠进行抑郁样行为检测;免疫荧光双标法检测小鼠中缝背核脑区5-羟色胺(5-HT)神经元和BDNF蛋白的共定位;采用实时荧光定量PCR(Q-PCR)和Western blot方法检测小鼠中缝背核脑区组织中总BDNF mRNA、BDNF外显子(Exons) mRNA及蛋白表达水平,并进行CUS所致小鼠抑郁样行为与总BDNF mRNA之间的相关性分析。结果 CUS能导致小鼠糖水偏好值明显降低($P<0.05$),强迫游泳不动时间明显增加($P<0.05$)。BDNF与中缝背核5-HT神经元存在共定位。CUS能导致小鼠中缝背核脑区总BDNF mRNA和蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。相关性分析结果显示CUS组小鼠糖水偏好值与总BDNF mRNA存在显著正相关性($P<0.05$);CUS组小鼠FST不动时间与总BDNF mRNA存在显著负相关性($P<0.05$)。BDNF Exons mRNA检测结果显示CUS能导致小鼠中缝背核脑区BDNF Exon IV($P<0.05$)和VI($P<0.05$) mRNA表达降低,而Exon I($P>0.05$)和Exon II mRNA($P>0.05$)表达则没有显著变化。结论 CUS能诱导产生抑郁样行为,并能导致中缝背核脑区5-HT神经元中BDNF表达的降低。

关键词 慢性不可预知应激;抑郁样行为;中缝背核;5-羟色胺;脑源性神经营养因子

中图分类号 R 749;R 395.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1918-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.016

抑郁症又称抑郁障碍,是一种普遍存在的、严重的、并且容易复发的精神疾病,以显著而持久的心境低落和快感缺失为主要特征^[1]。脑源性神经营养

因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是一种重要的神经营养因子,其基因存在多种剪切体,并且每个剪切体都有特定的启动子调控^[2]。研究^[3-5]报道前额叶皮层和海马的BDNF在抑郁症发病、围产期应激或青少年应激诱导成年后抑郁行为以及抗抑郁治疗中起着重要作用。此外,研究报道中缝背核5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)神经元广泛地投射到海马和前额叶皮层脑区^[6];中枢神经系统中5-HT功能降低、释放减少及突触间隙含量下降与抑郁症的发生密切相关^[7-8]。但是中缝背核脑区BDNF在抑郁症发病中的作用尚未报道。该研究利用慢性不可预知应激(chronic unpredictable stress, CUS)小鼠抑郁模型,结合实时荧光定量PCR(Q-PCR)和Western blot检测中缝背核脑区BDNF的变化情况,为研究抑郁症的发病机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20只雄性SPF级C57BL/6小鼠,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%。本研究中动物实验均经本单位动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 总RNA提取试剂盒(美国Omega公司);RNA反转录试剂盒(大连宝生物工程公司);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗BDNF单克隆抗体,鼠抗5-HT多克隆抗体(英国Abcam公司);鼠抗 β -actin单克隆抗体(美国Cell signaling公司);羊抗兔二抗IR Dye800CW,驴抗鼠二抗IR Dye680LT,双红外激光成像系统Odyssey Sa(美国Li-COR公司);ALexa fluor 488 驴抗鼠荧光二抗、ALexa fluor 546 驴抗兔荧光二抗(美国Thermo Fisher公司)。共聚焦显微镜购自日本东京奥林巴斯有限公司(FV1200)、Real-time PCR仪(StepOnePlus)(美国麻省ABI公司)。

1.2 方法

1.2.1 CUS抑郁模型的建立 20只小鼠按随机数

2019-06-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81601189);山东省自然科学基金(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 肿瘤研究实验室 滨州 256603

作者简介:孟凡涛 男 助教;

李 晨 男 讲师 责任作者 E-mail: lc_0625@163.com

字表法分成对照组与模型组,每组各 10 只。第 1 天束缚 2 h,第 2 天 24 h 光照,第 3 天电击 10 min(0.3 mA 电击 2 s,间歇 16 s,共 10 min),第 4 天夹尾 15 min,第 5 天高台 30 min,第 6 天 24 h 湿盒并倾斜 45°,第 7 天冷水游泳(8 °C),第 8 天束缚 2 h,第 9 天 24 h 光照,第 10 天电击 10 min(0.3 mA 电击 2 s,间歇 16 s,共 10 min),第 11 天夹尾 15 min,第 12 天高台 30 min,第 13 天 24 h 湿盒并倾斜 45°,第 14 天冷水游泳(8 °C),第 15 天束缚 2 h,第 16 天 24 h 光照,第 17 天电击 10 min(0.3 mA 电击 2 s,间歇 16 s,共 10 min),第 18 天夹尾 15 min,第 19 天高台 30 min,第 20 天 24 h 湿盒并倾斜 45°,第 21 天冷水游泳(8 °C)。抑郁模型组小鼠单笼饲养,应激结束后经抑郁样行为试验评判模型是否成功的指标。

1.2.2 糖水偏好试验(sucrose preference, SPT)

慢性应激 21 d 结束后,剥夺饮水 5 h,2 个相同的水瓶分别放置鼠笼的 2 侧,水瓶内分别装有 1% 蔗糖水与饮用水,测定夜间 12 h 内小鼠的糖和水的消耗量,糖水饮用量占糖和水总饮用量的百分比反映小鼠快感缺乏程度。

1.2.3 强迫游泳试验(forced swimming test, FST)

将小鼠放置于透明树脂水桶中,水温 24 °C,强迫游泳 6 min,记录小鼠后 4 min 内静止不动的时间,以小鼠在绝望环境中试图逃脱又无法逃脱的状态评判小鼠的抑郁程度。

1.2.4 RNA 提取、cDNA 合成及 Q-PCR 按照组织总 RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司)说明书提取海马总 RNA,然后利用 RNA 反转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司)将 RNA 反转录合成 cDNA,最后用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 Q-PCR 检测相关基因表达水平,20 μ l 反应体系,具体反应条件:95 °C、5 min,95 °C、10 s,60 °C、30 s,40 个循环,并建立溶解曲线,95 °C、15 s,60 °C、60 s,95 °C、15 s。以 Actin 作为内参基因。以溶解曲线确定 PCR 反应的特异性,根据荧光曲线的循环阈值(cycle threshold, CT),按照 $\Delta\Delta$ CT 方法计算基因的相对表达量。引物序列如下^[9-10]:总 BDNF mRNA:上游引物:5'-GCGCCCATGAAAGAAGTAAA-3',下游引物:5'-TCGTCAGACCTCTCGAACCT-3'; Exon I:上游引物:5'-CTAGCCACCGGGGTGGTGTA-3',下游引物:5'-AGGATGGTCATCACTCTTCTC-3'; Exon II:上游引物:5'-CTAGCCACCGGGGTGGTGTA-3',下游引物:5'-AGGATGGTCATCACTCTTCTC-3'; Exon IV:上游引物:5'-CAGAGCAGCTGC-

CTTGATGTT-3',下游引物:5'-GCCTTGTCCTG-GACGTTTA-3'; Exon VI:上游引物:5'-CTGGGAG-GCTTTGATGAGAC-3',下游引物:5'-GCCTTCATG-CAACCGAAGTA-3'; Actin:上游引物:5'-GATCATT-GCTCCTCCTGAGC-3',下游引物:5'-ACTCCTGCTT-GCTGATCCAC-3'。

1.2.5 Western blot CUS 结束后,小鼠断头,并在冰上迅速分离海马,置液氮中速冻, -80 °C 保存备用。取出海马用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液进行裂解,然后加入 5 \times 上样染料,沸水煮 10 min,然后用 12% 或 15% SDS-PAGE 胶进行分离,并转到 PVDF 膜上,膜用 TBST buffer (20 μ mmol/L TRIS-HCl, pH 7.4, 150 μ mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 配制的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,然后经过一抗(1:1 000)过夜孵育,加荧光二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,经 Odyssey Sa 双红外激光成像系统成像并进行灰度识别分析。

1.2.6 免疫荧光 脑片制备 C57BL/6 小鼠 4% 水合氯醛深度麻醉后,经 4% 多聚甲醛固定后,取脑组织,经 30% 蔗糖水脱水后进行冰冻切片,厚度 40 μ m。免疫荧光染色:取中缝背核脑区的脑片经封闭液封闭后,加入一抗混合液(兔抗 BDNF 1:200,鼠抗 5-HT 1:500)4 °C 孵育过夜,加入二抗混合液(Alexa fluor488 驴抗鼠二抗 1:400, Alexa fluor 546 驴抗兔二抗 1:400)4 h,封片剂封片,最后用共聚焦显微镜观察并拍照。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 6.0 进行统计分析并制图。用 Shapiro-Wilk 检验验证各组的正态分布情况。相关性分析用 Pearson's correlation coefficient 进行检验。各组数值以表示,两组间比较采用 T 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CUS 模型小鼠抑郁行为表型检测 糖水偏好和强迫游泳试验结果:小鼠按照试验设计流程进行 21 d CUS,并在第 22 天进行 SPT,第 23 天进行 FPT,第 24 天分离中缝背核收取组织,见图 1A。结果显示,与 Control 比较,CUS 组小鼠糖水偏好值明显降低($t = 2.368$, $P < 0.05$),见图 1B。FPT 结果显示 CUS 组小鼠不动时间明显高于 Control 组($t = 2.773$, $P < 0.05$),见图 1C。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布($P > 0.05$)。

2.2 中缝背核脑区 BDNF 和 5-HT 免疫荧光双标结果 BDNF 为红色荧光,5-HT 为绿色荧光,BDNF

和 5-HT 两种蛋白荧光重叠之后呈现黄色,见图 2,结果表明中缝背核 5-HT 神经元中有 BDNF 表达。

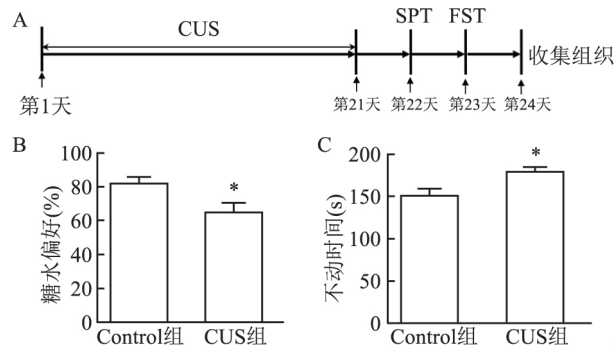


图1 CUS组和对照组小鼠糖水偏好和强迫游泳试验结果

A: CUS模型试验步骤设计图; B: SPT; C: FST; 与Control组比较: * $P < 0.05$

2.3 CUS组和Control组小鼠中缝背核BDNF mRNA和蛋白表达量 BDNF mRNA检测结果显示与Control组比较,CUS组BDNF mRNA表达量

明显降低($t = 3.56, P < 0.01$),见图3A。BDNF蛋白Western blot,见图3B;数据统计分析结果,见图3C,CUS组BDNF蛋白表达量明显降低($t = 2.713, P < 0.05$)。Shapiro-Wilk检验各组数据均符合正态分布($P > 0.05$)。

2.4 CUS所致小鼠抑郁样行为与中缝背核BDNF mRNA相关性分析结果 CUS所致小鼠抑郁样行为与总BDNF mRNA相关性分析结果显示,CUS组小鼠糖水偏好值与总BDNF mRNA存在显著正相关性($P < 0.05$),见图4A,CUS组小鼠强迫游泳实验不动时间与总BDNF mRNA存在显著负相关性($P < 0.05$),见图4B。Shapiro-Wilk检验各组数据均符合正态分布($P > 0.05$)。

2.5 CUS组和Control组小鼠中缝背核BDNF exons mRNA表达量与Control组比较,CUS组BDNF Exon I mRNA表达量没有显著变化($t = 0.509, P > 0.05$),见图5A; Exon II mRNA表达量没有显著变化($t = 0.916, P > 0.05$),见图5B; Exon IV mRNA

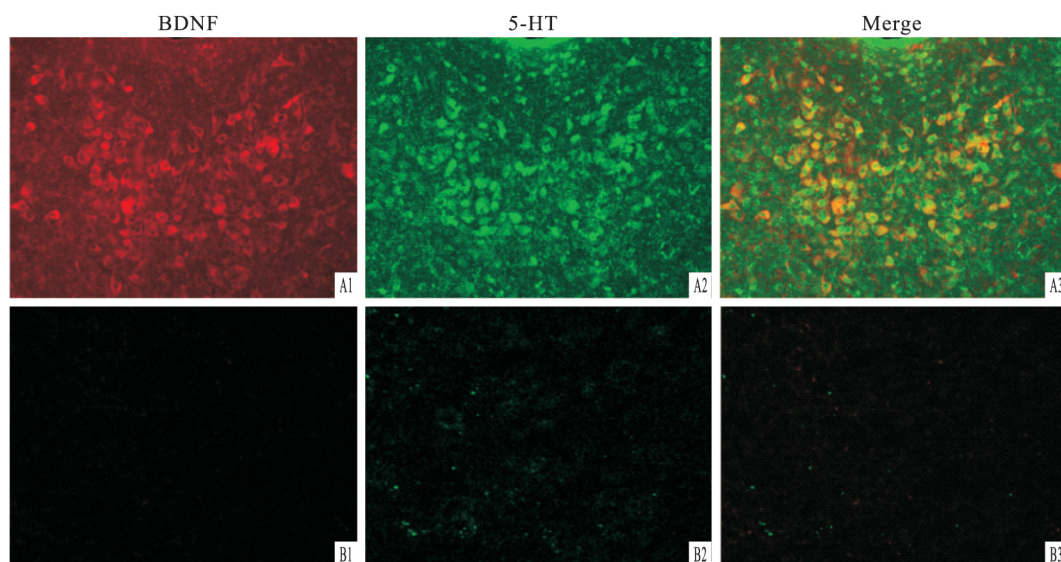


图2 BDNF和5-HT免疫荧光双标结果 $\times 200$

A: 有一抗组; B: 无一抗组; 1: BDNF蛋白染色; 2: 5-HT染色; 3: BDNF和5-HT染色合并图

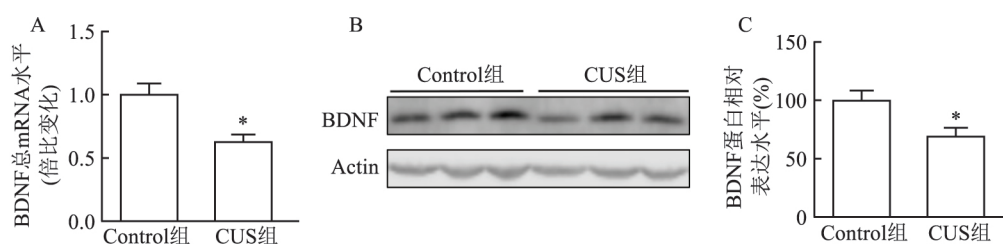


图3 CUS组和对照组小鼠中缝背核BDNF mRNA和蛋白表达水平

A: BDNF mRNA水平;与Control组比较: * $P < 0.05$; B: BDNF蛋白水平 Western blot图; C: BDNF蛋白水平 Western blot统计图;与Control组比较: * $P < 0.05$

表达量明显降低($t = 2.798$, $P < 0.05$); Exon VI mRNA 表达量明显降低($t = 2.419$, $P < 0.05$)。Shapiro-Wilk 检验各组数据均符合正态分布($P > 0.05$)。

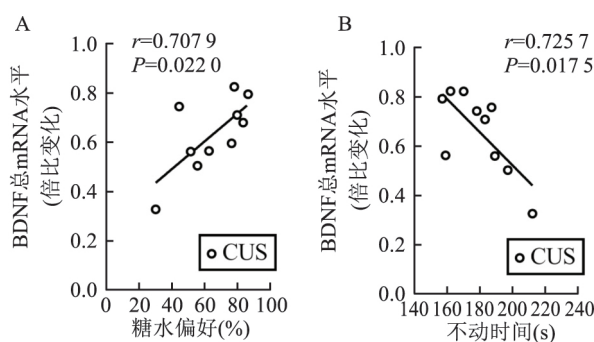


图4 CUS所致小鼠抑郁样行为与中缝背核 BDNF mRNA 相关性分析

A: SPT 与 BDNF mRNA 相关性分析结果; B: FST 与 BDNF mRNA 相关性分析结果

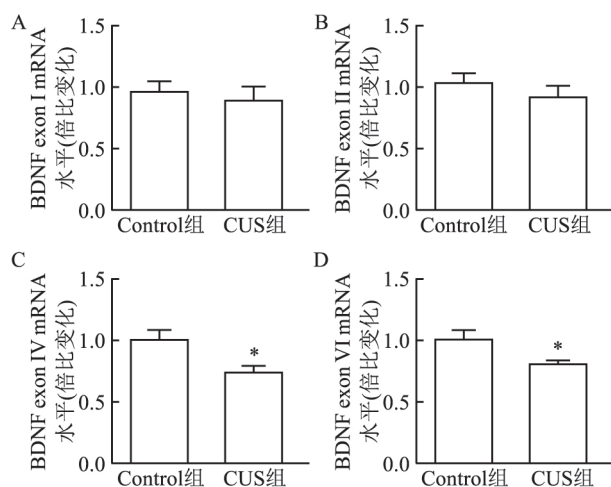


图5 CUS组和Control组小鼠中缝背核 BDNF exons mRNA 表达水平

A: Exon I; B: Exon II; C: Exon IV; D: Exon VI; 与 Control 组比较:

* $P < 0.05$

3 讨论

人类抑郁症的核心症状是快感缺乏症,即无法体验快乐。对蔗糖溶液的偏好超过了对水的偏好实验已被用作衡量啮齿动物对自然奖励的快感反应,而被强迫游泳实验被广泛用于评估绝望行为,其中的不动时间被称为“绝望”。这两个行为被广泛用于抑郁样和抗抑郁行为的评价^[11]。本研究证明 CUS 能诱导小鼠产生糖水偏好降低和强迫游泳不动时间增加的抑郁样行为,说明建立的模型能够反映抑郁症的主要表型。

BDNF 作为一种重要的神经营养因子,其在神经元的分化、再生、存活及神经和突触可塑性中发挥重要作用^[12]。研究^[5]报道 BDNF 在抑郁症的发病机制和抗抑郁治疗中起重要作用,但是其研究脑区主要位于前额叶皮层、海马、中脑腹侧被盖区及伏隔核等。最近一篇研究^[13]报道中缝背核脑区特异性敲除 BDNF 后小鼠在基础条件下糖水偏好和强迫游泳实验均没有表现出抑郁样行为。本研究证明中缝背核脑区 5-HT 神经元与 BDNF 共存,说明 5-HT 神经元中有 BDNF 表达, CUS 能导致总 BDNF mRNA 和蛋白表达量降低,这与抑郁状态下 BDNF 在其他脑区的变化一致^[14],说明中缝背核脑区 5-HT 神经元中的 BDNF 的确也参与了抑郁症发病。BDNF 有多个剪切体,文献^[5, 15]报道不同剪接体的空间分布和功能不同^[15],但是不同剪切体的具体生物学功能目前尚不清楚,其中 Exon IV 和 Exon VI 在精神疾病的发病和治疗中发挥更重要的作用,这与本研究结果 CUS 能特异性降低中缝背核脑区 BDNF Exon IV 和 Exon VI 的表达一致,这进一步说明中缝背核脑区 BDNF 与抑郁症的发病相关。

综上所述,本研究证明 CUS 能显著诱导小鼠产生抑郁样行为,中缝背核脑区 5-HT 神经元中存在 BDNF 的表达,并且 CUS 能显著降低中缝背核脑区 BDNF 的表达。以上结果提示中缝背核脑区 BDNF 参与抑郁症的发病,但是其发挥作用的具体机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Smith K. Mental health: a world of depression [J]. Nature News, 2014, 515(7526): 181.
- [2] Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, et al. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(3): 525-35.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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(1): 21-31.
- [6] Fernandez S P, Cauli B, Cabezas C, et al. Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons projecting to the forebrain [J]. Brain Struct Funct, 2016, 221(8): 4007-25.

- [7] Yohn C N , Gergues M M , Samuels B A . The role of 5-HT receptors in depression [J]. *Mol Brain* , 2017 , 10(1) : 28.
- [8] McDevitt R A , Neumaier J F . Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective [J]. *J Chem Neuroanat* , 2011 , 41(4) : 234 – 46.
- [9] Zajac M S , Pang T Y , Wong N , et al . Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice [J]. *Hippocampus* , 2010 , 20(5) : 621 – 36.
- [10] Guo M , Li C , Lei Y , et al . Role of the adipose PPAR γ -adiponectin axis in susceptibility to stress and depression/anxiety-related behaviors [J]. *Mol Psychiatry* , 2017 , 22(7) : 1056 – 68.
- [11] Guo M , Lu Y , Garza J C , et al . Forebrain glutamatergic neurons mediate leptin action on depression-like behaviors and synaptic depression [J]. *Transl Psychiatry* , 2012 , 2 : e83.
- [12] Duman R S , Malberg J , Nakagawa S , et al . Neuronal plasticity and survival in mood disorders [J]. *Biol Psychiatry* , 2000 , 48(8) : 732 – 9.
- [13] Adachi M , Autry A E , Mahgoub M , et al . TrkB signaling in dorsal raphe nucleus is essential for antidepressant efficacy and normal aggression behavior [J]. *Neuropsychopharmacology* , 2017 , 42(4) : 886 – 94.
- [14] Hing B , Sathyaputri L , Potash J B . A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* , 2018 , 177(2) : 143 – 67.
- [15] Baj G , Leone E , Chao M V , et al . Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2011 , 108(40) : 16813 – 8.

Changes of BDNF expression in the dorsal raphe nucleus of depressed mice induced by chronic unpredictable stress

Meng Fantao , Liu Jing , Wang Wentao , et al

(*Institute for Metabolic and Neuropsychiatric Disorders , Binzhou Medical University Hospital , Binzhou 256603*)

Abstract Objective To detect the expression of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the brain region of dorsal raphe nucleus in chronic unpredictable stress (CUS) mice. **Methods** 20 C57 mice were divided into two groups randomly: control group ($n = 10$) and chronic unpredictable stress group ($n = 10$). The stress group was subjected to 21 days CUS , the control group was handled once per day. The depressive-like behaviors of the two groups were tested by sucrose preference test (SPT) and forced swimming test (FST). The co-localization of 5-HT neurons and BDNF protein in the dorsal raphe nucleus of mice was detected by immunofluorescence double labeling. Q-PCR and Western blot were used to detect the expression levels of total BDNF mRNA , BDNF Exons mRNA and protein in the dorsal raphe nucleus of mice , and the correlation between depression-like behaviors and total BDNF mRNA was analyzed. **Results** Chronic unpredictable stress can significantly reduce the sucrose preference of the mice ($P < 0.05$) , and the immobility time of forced swimming test was significantly increased in CUS mice ($P < 0.05$). BDNF was co-located with 5-HT neurons in dorsal raphe nucleus. CUS can significantly reduce the expression of total BDNF mRNA and protein in the dorsal raphe nucleus of mice ($P < 0.05$). The results of correlation analysis showed that there was a significant positive correlation between sucrose preference and total BDNF mRNA in the CUS group ($P < 0.05$). There was a significant negative correlation between immobility time and total BDNF mRNA in the forced swimming test of mice in CUS group ($P < 0.05$). BDNF Exons mRNA test results showed that CUS could decreased the mRNA expression of BDNF Exon IV ($P < 0.05$) and VI ($P < 0.05$) in the dorsal raphe nucleus of mice , while the expression of Exon I ($P > 0.05$) and Exon II mRNA ($P > 0.05$) showed no significant changes. **Conclusion** CUS can induce depression-like behavior and reduce BDNF expression in 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus.

Key words chronic unpredictable stress; depressive behavior; dorsal raphe nucleus; 5-HT; BDNF