

网络出版时间: 2019-12-2 13:42 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.016.html>

## 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<sup>1</sup> 刘晶<sup>1</sup> 王文涛<sup>1</sup> 代娟娟<sup>2</sup> 游晶晶<sup>1</sup> 胡凤爱<sup>1</sup> 李晨<sup>1</sup>

**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<sup>[1]</sup>。脑源性神经营养

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<sup>1</sup> 代谢与神经精神疾病研究所、<sup>2</sup> 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

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<sup>[2]</sup>。研究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<sup>[6]</sup>; 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<sup>[7-8]</sup>。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(大连宝生物工程有限公司); 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); ALexfluor 488 驴抗鼠荧光二抗、ALexa fluor546 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

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 μl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ΔΔCT方法计算基因的相对表达量。引物序列如下<sup>[9-10]</sup>:总BDNF mRNA:上游引物:5'-GCCGCCATGAAAGAAAGTAAA-3',下游引物:5'-TCGTCAGACCTCTCGAACCT-3';Exon I:上游引物:5'-CTAGCCACCGGGGTGGTGTAA-3',下游引物:5'-AGGATGGTCATCACTCTTCTC-3';Exon II:上游引物:5'-CTAGCCACCGGGTGGTGTAA-3',下游引物:5'-AGGATGGTCATCACTCTTCTC-3';Exon IV:上游引物:5'-CAGAGCAGCTGC-

CTTGATGTT-3',下游引物:5'-GCCTTGTCCGTC-GACGTTTA-3';Exon VI:上游引物:5'-CTGGGAG-GCTTGATGAGAC-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×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 μmmol/L TRIs-HCl, pH 7.4, 150 μmmol/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 μm。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,CDNF

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。

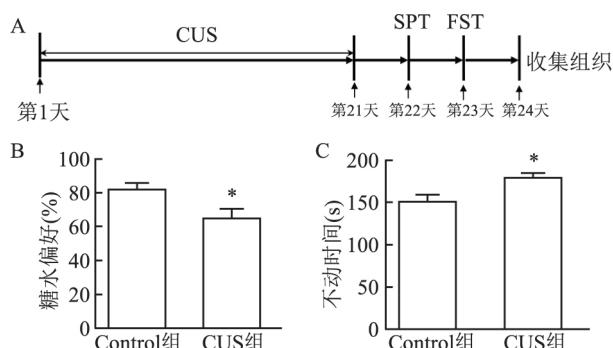


图 1 CUS 组和对照组小鼠糖水偏好和强迫游泳试验结果

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

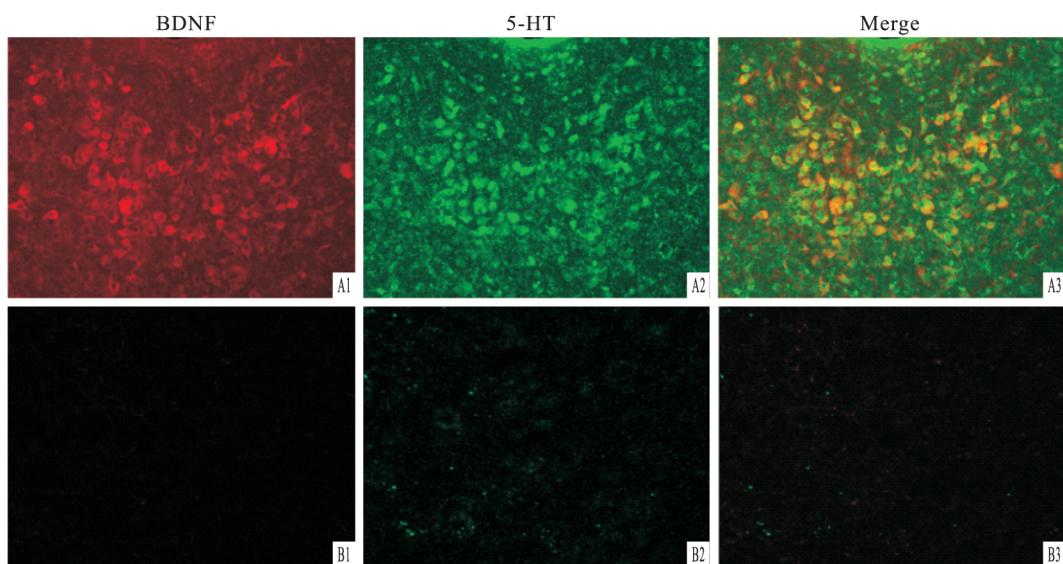


图 2 BDNF 和 5-HT 免疫荧光双标结果  $\times 200$

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

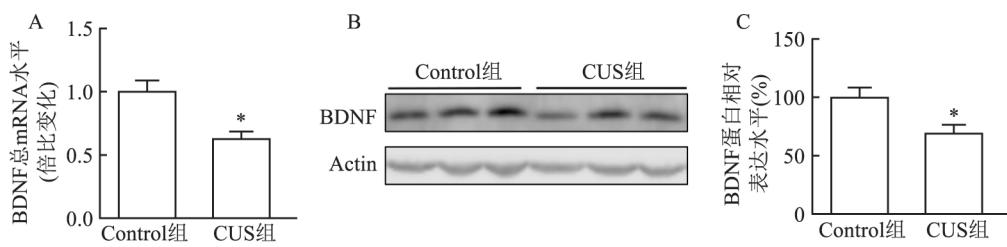


图 3 CUS 组和对照组小鼠中缝背核 BDNF mRNA 和蛋白表达水平

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 ( $P > 0.05$ ) 。

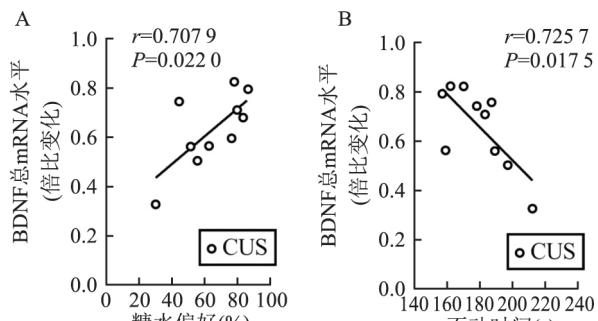


图 4 CUS 所致小鼠抑郁样行为与中缝背核 BDNF mRNA 相关性分析

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

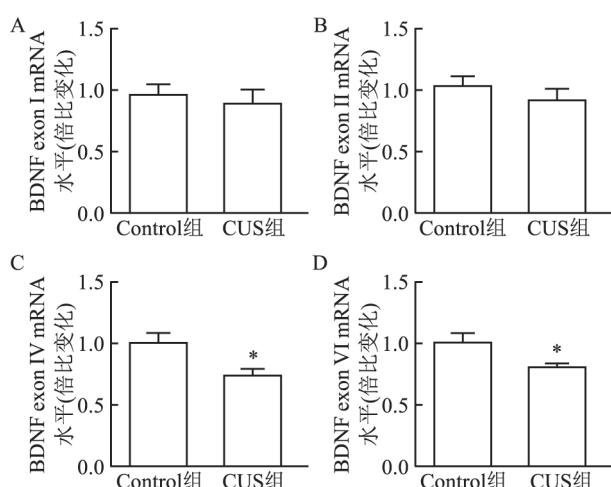


图 5 CUS 组和 Control 组小鼠中缝背核 BDNF exons mRNA 表达水平

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<sup>[11]</sup>。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<sup>[12]</sup>。研究<sup>[5]</sup>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<sup>[13]</sup>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<sup>[14]</sup>, 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<sup>[5, 15]</sup>报道不同剪接体的空间分布和功能不同<sup>[15]</sup>, 但是不同剪接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 $\gamma$ -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 , 77(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