

维生素 D 水平对产后小鼠情绪及运动能力的影响

段冬霞¹, 刘小青², 高正良^{1,3}

(1. 同济大学附属第十人民医院转化医学中心, 上海 200072; 2. 同济大学医学院, 上海 200092;
3. 同济大学医学院转化医学中心, 上海 200092)

【摘要】目的 探讨维生素 D 水平对小鼠产后情绪、运动能力等行为的影响。方法 产后小鼠给予不同剂量水平的维生素 D, 包括正常摄取剂量(1 000 IU/kg)、缺乏摄取剂量(0 IU/kg)和过量摄取剂量(10 000 IU/kg), 利用旷场实验、黑白箱穿梭实验、悬尾实验、强迫游泳和转棒实验等行为范式连续 10 周跟踪检测小鼠的行为表型。结果 旷场实验和转棒实验表明维生素 D 对小鼠的自发活动和运动协调能力基本没有影响; 黑白箱实验中小鼠在白箱停留时间和黑白箱穿梭次数均没有差异, 因此维生素 D 对小鼠产后焦虑情绪没有影响; 悬尾试验和强迫游泳实验结果提示三组小鼠的不动状态从整体变化趋势来看基本接近。结论 维生素 D 水平长期摄取对小鼠产后焦虑、抑郁情绪和产后运动能力没有持续性影响。

【关键词】维生素 D; 产后情绪; 运动能力; 行为测试; 小鼠

【中图分类号】Q 426 **【文献标志码】**A **【文章编号】**1008-0392(2017)02-0028-05

Effect of vitamin D on athletic performance and mood of postpartum mice

DUAN Dong-xia¹, LIU Xiao-qing², GAO Zheng-liang^{1,3}

(1. Dept. of Translational Medicine Center, Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China;
3. Dept. of Translational Medicine Center, Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of vitamin D on postpartum mood and athletic performance in mice. **Methods** Vitamin D was given to postpartum mice for 14 weeks, with a normal dose ($n=27$, 1 000 IU/kg), deficient dose ($n=25$, 0 IU/kg) or overdose ($n=22$, 10 000 IU/kg). The maternal depressive-like behaviors was examined by using tail suspension test (TST), forced swim test (FST), dark-light box (DLB), open field and rotarod for 10 weeks. **Results** Vitamin D had little effect on the athletic activity with open field and rotarod tests. Dark-light box revealed that there was no effect of vitamin D on the anxiety. In addition, tail suspension and forced swim tests indicated that vitamin D had no effect on postpartum depression. **Conclusion** Vitamin D shows no persistent effect on athletic activity and postpartum mood in mice.

【Key words】 vitamin D; postpartum mood; athletic performance; animal behavior test; mice

收稿日期: 2016-09-12

基金项目: 国家自然科学基金(31371497); 国家自然科学基金青年项目(31301063)

作者简介: 段冬霞(1990—), 女, 硕士. E-mail: duan_dx@126.com

通信作者: 高正良. E-mail: zhengliang_gao@tongji.edu.cn

近年来,关于产后焦虑、抑郁的发病情况及影响因素的研究越来越受到重视。分娩会使产妇产生焦虑和抑郁等不同的应激反应,而这些产后的情绪变化对女性生理和心理上的变化有着重要影响,同时也会严重危害新生儿的身心健康^[1]。

产后抑郁症(postpartum depression, PPD)是指产妇在产褥期内出现的一种慢性精神症状,主要表现为头痛失眠、情绪低落、焦虑烦躁等。产后抑郁作为最常见的分娩后并发症之一,通常在产后6周内发病,严重的甚至持续1~2年。其发病原因可能与多种因素(遗传因素、神经内分泌因素、心理因素以及社会因素等)相关,但目前尚无明确结论。产后焦虑往往与产后抑郁同时发生,也是一种长时间的情感性精神障碍疾病。作为产后易于发生的情绪变化,二者兼存于女性分娩后时期。

流行病学和临床病例调查发现,焦虑抑郁情绪与维生素D水平存在相关性^[2-3]。孕期、孕中期以及产前维生素D的失衡会增加产后患抑郁症的发生概率^[4-5]。产后25-羟基维生素D低水平者在爱丁堡产后抑郁量表(Edinburgh Postpartum Depression Scale, EPDS)得分高,提示产后维生素D水平与产后抑郁有相关性,但结论并不确切^[6]。Minasyan等^[7]利用维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)突变小鼠发现VDR的突变可以影响情感、焦虑以及抑郁状态,但对抑郁的影响作用相对较小,Fu等^[8]在临床病例上也得到了相同的结果。此外,有研究^[9]报道运动能力与抑郁相关,加强锻炼可以有效干预抑郁。本研究通过建立维生素D正常、缺失和过量的小鼠模型,并运用动物行为学来研究维生素D对小鼠产后情绪以及运动能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康成年雌性C57BL/6小鼠,体质量18~24 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。动物房室温25℃、湿度为45%,明暗交替时间为12 h,动物可自由饮食进水。

根据文献报道^[10-12],本研究小鼠饲料选定维生素D3 1 000 IU/kg作为标准剂量。进而选取0 IU/kg作为缺乏剂量以及10 000 IU/kg作为过量

剂量。饲料中其他成分一致,由南通特洛菲饲料科技有限公司提供。

将C57BL/6小鼠雌雄合笼交配怀孕,于分娩后将母鼠随机平均分成三组单独喂养,分别喂以含有不同剂量维生素D的饲料,制备维生素D正常、缺乏和过量小鼠模型:维生素正常组(ST组)1 000 IU/kg、维生素D缺乏组(DE组)0 IU/kg、维生素D过量组(OV组)10 000 IU/kg。

1.2 方法

喂养2周后开始在不同的时间段内检测各组母鼠的一系列行为学表现。行为测试遵循从弱刺激(开放场/旷场实验、明暗箱)到强刺激(悬尾实验、强迫游泳、加速转棒实验)的顺序进行,不同行为范式之间有1~2 d的恢复期。

1.2.1 旷场实验(open field test, OFT) 旷场实验可以检测小鼠自发活动行为和探索行为,是用于评价小鼠自发活动以及焦虑状态经典行为学实验。其中运动距离作为检测小鼠自发活动的主要指标,中央区域的活动作为焦虑状态的主要指标。旷场是一个40 cm×40 cm×40 cm的无盖的封闭区域。将小鼠放在旷场的一个角,软件自动记录小鼠在开放场中30 min的自主运动情况,并从软件中导出5 min和30 min小鼠运动的总距离以及在中心区域停留的时间和次数等参数。

1.2.2 黑白箱实验(dark/light box, DLB) 黑白箱是一个50 cm×30 cm×30 cm的树脂板盒子,由占1/3体积的不透明黑箱(有盖,30 cm×20 cm×30 cm)和占2/3体积的透明白箱(无盖,30 cm×30 cm×30 cm)组成,在黑箱与白箱相连壁的底部正中有个小的门洞(5 cm×7 cm),小鼠可从该门穿梭于两箱,每次将小鼠放入黑箱同一位置内,并由摄像头记录小鼠5 min内在白箱停留的时间以及在两箱穿梭的次数。

1.2.3 悬尾实验(tail suspension test, TST) 用胶带将小鼠悬挂于距离台面50 cm的支架边缘上,胶带粘贴位置距小鼠尾尖1~2 cm处,腹部对准摄像头,摄像记录6 min,统计最后4 min小鼠静止不动的累计时间:即小鼠放弃挣扎,呈僵直状态,或仅有细小的肢体运动的持续时间总和。

1.2.4 强迫游泳实验(forced swim test, FST) 将小鼠放入玻璃烧杯中,水温保持在25~27℃。摄像

头检测 6 min, 在 小鼠 在其中 游泳 2 min 后, 记录 接下来 4 min 内 小鼠 的 不动性 的 累计 时间: 即 小鼠 在 水中 放弃 挣扎, 呈 直立 漂浮 状态, 或 仅有 细小 的 肢体 运动 以 保持 头部 浮在 水面 的 持续 时间 总和。

1.2.5 转棒实验(rota rod) 转棒可用于研究小鼠的动作协调性和抗疲劳性。实验时将小鼠分别放在粗糙的转棒上, 在 5 r/min 的匀速转速下学习 5 min 后进行测试, 测试阶段转速设置为匀加速转速, 即在 5 min 内将转速从 5 r/min 加速到 40 r/min, 持续 5 min。在训练过程中掉落的小鼠放回转棒上直至测试结束。测试小鼠在棒上停留的时间, 每只小鼠测试 4 次, 取平均值。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计分析软件对多组间数据进行单因素方差分析, 选用 LSD 方法 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 维生素 D 对运动能力的影响

2.2.1 维生素 D 摄取失衡对于自发活动没有持续性影响 在 30 min 的旷场实验中, 三组小鼠的活动总路程虽然在第 2 周时差值较大, 可能提示维生素失衡的潜在的影响, 但是从整体趋势上看, 随着维生素 D 摄取时间增长, 三组小鼠的活动总路程变化趋势逐渐接近, 三者差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1A)。而且三组小鼠之间在旷场中平均速度的变化趋势和总路程也基本一致 ($P > 0.05$, 图 1B)。

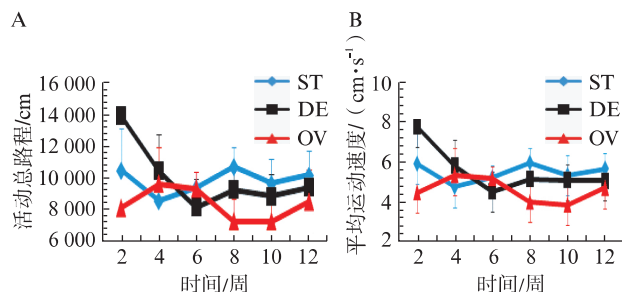


图 1 小鼠活动整体情况

Fig.1 Activity in the open field test

A: 30 min 内总路程; B: 平均速度; ST: $n=27$; DE: $n=25$; OV: $n=22$

2.1.2 维生素 D 摄取失衡对运动协调能力没有持续性影响 维生素 D 摄取第 8 周开始到 12 周结束, 三组小鼠在转棒上停留时间的差值较大, 差异无统

计学意义。另外在测试过程中, 随着维生素 D 摄取时间变长, 三组小鼠在转棒上停留时间也在波动性地缓慢增加。从整体变化趋势上看, 每个时间点三组之间的差异都非常小, 在棒上停留时间也都很接近, 见图 2。

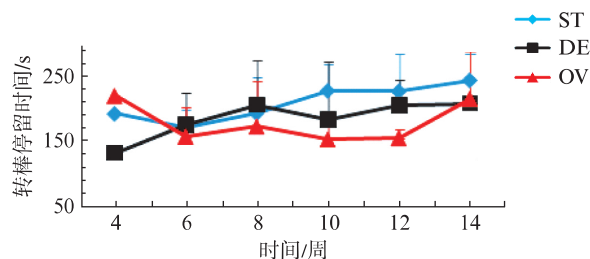


图 2 小鼠在转棒上停留时间

Fig.2 Duration on the rota rod

2.2 维生素 D 对产后情绪的影响

2.2.1 维生素 D 摄取失衡不会影响产后焦虑情绪

在旷场实验中, 检测前 5 min 小鼠活动的总路程以及在中央区域的活动可以更好的反映出小鼠兴奋性以及焦虑等情绪。前 5 min 中的中央区活动时间三组运动变化趋势一致, 且三组之间的区别不大。在第 8 周, OV 组高于其他两组, 但是差异无统计学意义, 小鼠进入中央区次数以及潜伏期都是在第 4 周时三组之间有较为明显的变化, 但差异无统计学意义, 见图 3。

在黑白箱实验中, 第 4 周时小鼠在白箱停留的时间和穿过黑白箱的次数三组差值较大, OV 组的白箱停留时间和穿过次数要低于其他两组, 但是三组之间差异无统计学意义, 在随后的时间里三组变化趋势逐渐靠拢, 见图 4。

2.2.2 维生素 D 摄取失衡对于产后抑郁情绪的可能影响 悬尾实验是检测小鼠抑郁的行为学方法, 测试指标为后 4 min 不动状态持续的累计时间。如图 5A 所示, 从第 5 周开始到 13 周结束, 三组小鼠不动状态时间为 100 ~ 150 s, 第 7 周时 DE 组不动时间最短, 但在第 11 周时 OV 组不动时间最短。从以上可以看出在悬尾实验中小鼠的这种不动状态在三组之间从整体趋势上是接近的。

本研究还利用强迫游泳来检测小鼠的抑郁情绪。如图 5B 所示, 在第 6 周、第 10 ~ 14 周, 三组小鼠之间两两组比较, 不动状态时间都有较大差值存在, 在 130 s 上下波动, 但是三组之间差异无统计学意义。

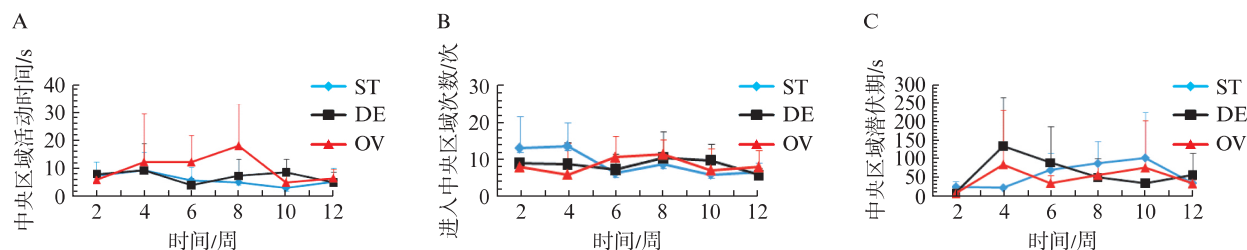


图3 小鼠中央区活动情况

Fig. 3 Activity in the central area

A: 中央区活动时间; B: 进入中央区次数; C: 中央区潜伏期

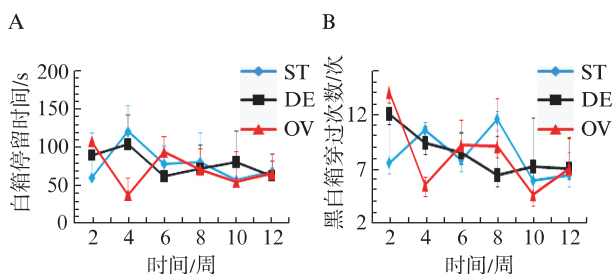


图4 小鼠在白箱停留时间和穿过次数

Fig. 4 Duration and entries in light box

A: 白箱停留时间 B: 穿过次数

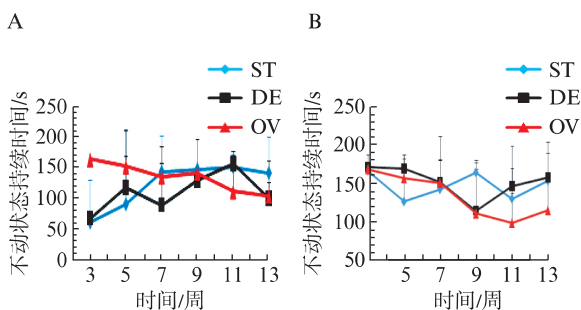


图5 抑郁样行为检测

Fig. 5 Depressive-Like behavior test

A: 悬挂检测; B: 强迫游泳检测

3 讨 论

旷场实验可以检测其焦虑程度以及运动能力, 根据检测时间的不同检测的目的也不同, 长时间可以检测小鼠自主运动能力(总运动距离和平均速度), 短时间可以检测焦虑(中央区域停留的时间)。本旷场实验^[13]通过检测小鼠30 min内的运动距离和平均速度, 发现三组之间的自主活动能力并没有差异, 通过检测5 min内在中央区域的活动, 其焦虑程度也没有差异; 转棒实验^[14]检测四肢协调能力和抗疲劳性, 虽然三组之间在转棒上停留时间都在变成, 但是趋势却很相近。也就是说维生素D正常、缺乏和过量摄取对小鼠的运动行为能力影响甚微。

黑白箱实验^[15]是检测小鼠焦虑样水平常用的实验方法, 利用动物避暗特性(趋黑箱)和探索特性(趋白箱)进行动物行为的研究。三组小鼠在白箱停留的时间随摄取时间延长而趋势靠近, 但是穿梭在黑箱和白箱的次数呈波动变化, 即便在个别时间点次数差距较大, 也没有显著性差异, 并且还需要另外的行为学实验(比如高架十字实验)进行辅助鉴定。因此在本文中维生素D对小鼠的焦虑水平没有明显影响。

在抑郁样行为测试中最常用的测试是悬尾实验^[16]和强迫游泳实验^[17], 这两种方法都是利用不动性(immobility)作为“行为绝望”的衡量措施。悬尾实验中三组之间变化趋势逐渐接近, 过量组虽然整体不动状态在下降, 但是也没有统计学上的差异。这样的变化同样出现在强迫游泳实验中, 正常组和缺乏组处于上下波动状态, 过量组相对波动就很小。也就是说维生素D的这三种浓度并没有对小鼠的抑郁情绪造成影响。

以往关于维生素D与产后抑郁的研究都是基于流行病学和临床病例, 采用测量血清25-羟基维生素D的水平进行研究, 研究结果表明血清维生素D浓度与产后抑郁的程度呈负相关, 补充维生素D能有效防治产后抑郁症状, 但是尚不能确定产后长期不同剂量摄取对这些情绪的影响。维生素D可以从食物和光照中摄取, 光照摄取不易检测, 因此本研究通过食物喂养的方法, 使食物中的维生素D含量作为唯一变量, 选取不同剂量喂养小鼠, 连续监测10周小鼠的行为学变化, 以确定不同剂量的维生素D对产后小鼠的情绪和运动能力产生的长期影响。本文选用维生素D的三种剂量0 IU/kg, 1 000 IU/kg, 10 000 IU/kg处理小鼠, 通过一系列的行为检测, 发现这三种剂量对产后母鼠10周内的焦虑情绪、抑郁情绪以及运动能

力均没有影响,即母鼠在产后 10 周内情绪和运动能力不受维生素 D 的影响。但是应该指出的是,尽管没有显著差别,实验中的确观察到在起始期维生素 D 失衡对于小鼠产后的运动能力和焦虑抑郁情绪都有一定程度的影响,但是这个影响随着时间的迁移和(或)实验训练的持续,逐渐减小直至消失,可能提示了维生素失衡的潜在影响,但是这种影响可能受到环境、学习记忆和其他实验条件的影响。有文献^[4-6,8]报道孕中期低血清 25-羟维生素 D 会导致产后不同时期抑郁焦虑风险的增加,孕妇孕期摄取低浓度维生素 D 与产后抑郁焦虑情绪有关,但孕期摄取高浓度维生素 D 却会促进产后抑郁等的风险增加,可以看出维生素 D 在孕期不同阶段的作用以及摄取剂量选取尚不明确,孕期的早晚和摄取剂量的高低,这些产前因素的出现可能也会导致产后情绪的变化,同时也有文献指出,血清 25-羟维生素 D 水平在分娩和产后的抑郁情况并没有显示直接的影响和联系^[18]。可以看出,对于维生素 D 的研究目前尚不能确定其功效,而且目前所发表的文献尚不能支持维生素 D 对防止或者治疗抑郁症状的作用,而且由于方法学的差异与检测的局限性,各项研究的结论也会有所不同。在本文中利用长时间监测的方式,虽然未能直接证实维生素 D 对产后抑郁焦虑的作用,但通过一系列的动态变化依然可以看到其对情绪的动态调节作用。对于临床实际意义而言,产后焦虑抑郁这种情绪上的变化,对家庭亲属之间的关系^[19]以及新生儿的身心健康都有千丝万缕的关系,因此无论是孕期、产前或者产后,如何更好地减缓甚至是治愈产后焦虑抑郁才是关键所在,未来可能需要探索更好的实验模型和条件,分析不同因素的互相作用对于产后焦虑、抑郁情绪的影响,从而更好地回答这一问题。

【参考文献】

- [1] PATEL M, BAILEY R K, JABEEN S, et al. Postpartum depression: a review [J]. *J Health Care Poor Underserved*, 2012, 23(2): 534-542.
- [2] BERK M, SANDERS K M, PASCO J A, et al. Vitamin D deficiency may play a role in depression [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69(6): 1316-1319.
- [3] MURPHY P K, WAGNER C L. Vitamin D and mood disorders among women: an integrative review [J]. *J Midwifery Womens Health*, 2008, 53(5): 440-446.
- [4] ROBINSON M, WHITEHOUSE A J, NEWNHAM J P, et al. Low maternal serum vitamin D during pregnancy and the risk for postpartum depression symptoms [J]. *Arch Womens Ment Health*, 2014, 17(3): 213-219.
- [5] GUR E B, GOKDUMAN A, TURAN G A, et al. Mid-pregnancy vitamin D levels and postpartum depression [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 179: 110-116.
- [6] MURPHY P K, MUELLER M, HULSEY T C, et al. An exploratory study of postpartum depression and vitamin D [J]. *J Am Psychiatr Nurses Assoc*, 2010, 16(3): 170-177.
- [7] MINASYAN A, KEISALA T, LOU Y R, et al. Neophobia, sensory and cognitive functions, and hedonic responses in vitamin D receptor mutant mice [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 104(3-5): 274-280.
- [8] FU C W, LIU J T, TU W J, et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D levels measured 24 hours after delivery and postpartum depression [J]. *BJOG*, 2015, 122(12): 1688-1694.
- [9] KVAM S, KLEPPE C L, NORDHUS I H, et al. Exercise as a treatment for depression: A meta-analysis [J]. *J Affect Disord*, 2016, 202: 67-86.
- [10] ROWLING M J, GLINIAK C, WELSH J, et al. High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice [J]. *J Nutr*, 2007, 137(12): 2608-2615.
- [11] BEATY M M, LEE EY, GLAUERT H P. Influence of dietary calcium and vitamin D on colon epithelial cell proliferation and 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats fed high fat diets [J]. *J Nutr*, 1993, 123(1): 144-152.
- [12] AGRAWAL T, GUPTA G K, AGRAWAL D K. Vitamin D supplementation reduces airway hyperresponsiveness and allergic airway inflammation in a murine model [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(6): 672-683.
- [13] PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1-3): 3-33.

(下转第 44 页)

- retrospective analysis illustrating the substantial clinical and economic burden of prostate cancer [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2010, 13(2): 162-167.
- [3] 那彦群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南: 2011 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [4] SZKANDERA J, KIESSLICH T, HAYBAECK J, et al. Hedgehog signaling pathway in ovarian cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1179-1196.
- [5] GONNISSEN A, ISEBAERT S, HAUSTERMANS K. Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 13979-14007.
- [6] WANG X D, INZUNZA H, CHANG H, et al. Mutations in the hedgehog pathway genes SMO and PTCH1 in human gastric tumors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54415.
- [7] SONG J, WANG Y, LI X, et al. Critical role of TRPC6 channels in the development of human renal cell carcinoma [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(8): 5115-5122.
- [8] ZENG B, YUAN C, YANG X, et al. TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(1): 103-116.
- [9] 史海鸿, 林建清, 郭启祥, 等. 瞬时受体电位通道蛋白 6 在人乳腺癌细胞中的表达及其对乳腺癌细胞侵袭能力的影响 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2014, 40(6): 1221-1225.
- [10] DONG W, XIANG L, JING L, et al. Effects of TRPC6 on invasibility of low-differentiated prostate cancer cells [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(1): 44-47.
- [11] MADAN R A, GULLEY J L. (R) Evolutionary therapy: the potential of immunotherapy to fulfill the promise of personalized cancer treatment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(1): 247.
- [12] YANG J M, WANG H J, DU L, et al. Screening and identification of novel B cell epitopes in human heparanase and their anti-invasion property for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(9): 1387-1396.
- [13] XU Y, HONG Y, XIAO Y, et al. Preparation and application of polyclonal antibody against a recombinant laccase [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(4): 315-317.
- [14] LIU H, LI X, NIU Z, et al. Preparation of polyclonal antibody specific for BRD7 and detection of its expression pattern in the human fetus [J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56(6): 531-538.

(上接第 32 页)

- [14] CURZON P, ZHANG M, RADEK R J, et al. The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, sensory gating, locomotor activity, rotarod, and beam walking [M]. // BUCCAFUSCO J J. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009.
- [15] CAMPOS A C, FOGACA M V, AGUIAR D C, et al. Animal models of anxiety disorders and stress [J]. *Rev Bras Psiquiatr*, 2013, 35 Suppl 2: S101-111.
- [16] CAN A, DAO D T, TERRILLION C E, et al. The tail suspension test [J]. *J Vis Exp*, 2012(59): e3769.
- [17] CAN A, DAO D T, ARAD M, et al. The mouse forced swim test [J]. *J Vis Exp*, 2012(59): e3638.
- [18] GOULD J F, ANDERSON A J, YELLAND L N, et al. Association of cord blood vitamin D at delivery with postpartum depression in Australian women [J]. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2015, 55(5): 446-452.
- [19] 李竺君. 抑郁症患者及其家属的家庭功能关系研究 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2013, 34(1): 103-107.