

慢性应激抑郁模型大鼠海马Trek-1、GFAP表达情况及氟西汀的干预作用

杨栋¹, 喻妍², 杨萍¹, 彭红莉¹, 傅锦华¹, 刘丽妮¹

(1.湖南省脑科医院,长沙410007;2.湖南省人民医院,长沙410005)

【摘要】 目的:研究慢性不可预知性应激(Chronic Unpredictable Stress, CUS)诱导的抑郁大鼠海马新型双孔钾离子通道亚单元Trek-1及胶质纤维酸性蛋白(Glial Fiber Acidic Protein, GFAP)的表达变化以及氟西汀的干预作用。**方法:**成年SD大鼠48只,随机选取12只为正常对照组,其余采用慢性不可预知性应激建立慢性应激抑郁模型。21d后随机分为CUS组、氟西汀低剂量组、氟西汀高剂量组;采用糖水偏爱实验、旷场试验评定大鼠抑郁水平;采用荧光实时定量聚合酶链反应测定大鼠海马Trek-1、GFAP mRNA表达, TUNEL染色观察海马神经元凋亡。**结果:**造模后, CUS组、氟西汀低、高剂量组糖水消耗、糖水偏爱、垂直运动次数和水平运动次数明显低于对照组;干预后, CUS组以上指标明显低于对照组, 氟西汀低、高剂量组经治疗后以上指标高于CUS组及干预前,但仍低于对照组。CUS组细胞凋亡率、Trek-1 mRNA表达显著升高, GFAP mRNA表达下降,较对照组相比有统计学意义;氟西汀低、高剂量组海马CA1区细胞凋亡率、Trek-1 mRNA表达下降, GFAP mRNA表达升高,与CUS组相比有统计学意义。**结论:**氟西汀可能通过改变海马Trek-1、GFAP表达,抑制细胞凋亡改善CUS大鼠抑郁症状。

【关键词】 慢性不可预知性应激; 抑郁; Trek-1; GFAP; 细胞凋亡

中图分类号: R395.1

DOI: 10.16128/j.cnki.1005-3611.2018.01.010

Expression of TREK-1 and Glial Fiber Acidic Protein in Hippocampus of Rats with Depression Induced by Chronic Unpredictable Stress and the Effect of Fluoxetine

YANG Dong, YU Yan, YANG Ping, et al.

Department of Psychiatrics, Brains Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China

【Abstract】 Objective: To explore the expression of Trek-1, Glial Fiber Acidic Protein(GFAP) in hippocampus of rats with depression induced by Chronic Unpredictable Stress(CUS), and the effect of fluoxetine. **Methods:** 12 rats were randomly selected from 48 adult SD rats as control group, others were performed as the depression model with CUS. After 21 d, the model rats were randomly divided into CUS group, fluoxetine low and high dose groups. Sucrose consumption test and open-field test were used to assess the behavior changes. The expression of Trek-1 and GFAP mRNA in hippocampus were measured with RT-PCR. Cell apoptosis was observed with TUNEL staining. **Results:** Before treatment, the consumption of sucrose, percentage of sucrose consumption, scores of vertical and horizontal movement were significantly lower in the CUS, fluoxetine low and high dose groups than control group. After treatment, compared with the control group, the above data in the CUS group decreased remarkably. However, the above data in the fluoxetine low and high dose groups were significantly higher than that in CUS group and before treatment, but still lower than that in the control group. Compared with the control group, the ratio of cell apoptosis and expression of Trek-1 mRNA increased significantly, while the GFAP mRNA decreased significantly in the CUS group. Compared with the CUS group, the ratio of cell apoptosis and expression of Trek-1 mRNA decreased significantly, while the GFAP mRNA increased significantly in the fluoxetine low and high dose groups. **Conclusion:** Fluoxetine can change the expression of Trek-1 and GFAP, inhibit the cell apoptosis, and subsequently improve the depression symptoms in rats.

【Key words】 Chronic unpredictable stress; Depression; TREK-1; Glial Fiber Acidic Protein; Cell apoptosis

研究发现,抑郁症等情绪障碍性疾病的发生发展与钾离子通道调节神经元的兴奋性有着密切的关系^[1]。双孔钾通道又称背景钾电流,可在全部生理电压范围内被激活,是神经元兴奋的重要基础^[2]。目

【基金项目】 湖南省科技厅一般项目(2014TT2013,2013FJ3118);湖南省科技厅重点研发计划项目(2015SK2032);湖南省教育厅一般项目(15C0835);湖南省人民医院2015年度仁术基金项目

通讯作者:喻妍

前研究证实TREK-1(TWIK-Related K+Channel 1)在脑内主要分布在大脑前额皮层、纹状体、杏仁核、丘脑下部以及海马区域等认知与情感记忆的区域,与抑郁中的兴趣感下降,动作迟缓相关^[3]。最近研究发现氟西汀可通过TREK-1通道发挥抗抑郁作用^[4],然而影响其表达的具体作用机制还不明确。本研究建立大鼠慢性不可预见性应激(chronic unpredictable stress, CUS)抑郁模型,以氟西汀为干预药

物,探讨CUS模型大鼠脑内Trek-1表达与胶质纤维酸性蛋白(Glial Fiber Acidic Protein, GFAP)、细胞凋亡的关系及氟西汀的干预作用,探讨Trek-1在抑郁症发生以及治疗的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性健康Sprague-Dawley大鼠48只,体质量200~220 g(合格证编号:43004700014842),由湖南中医药大学实验动物中心提供(许可证编号:SYXK[湘]2013-0005),饲养环境温度22~25℃,相对湿度50%~70%,自由饮食进水,分笼喂养。将48只大鼠随机分为正常对照组、CUS组、氟西汀低剂量组、氟西汀高剂量组,每组12只。

1.1.2 药物与试剂 Trek-1、GFAP引物(上海生工生物工程有限公司);细胞凋亡TUNEL原位检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);盐酸氟西汀(苏州礼来制药有限公司)。使用前用蒸馏水配成相应浓度药液。

1.2 方法

1.2.1 慢性不可预知性应激模型 参照文献^[5]制备CUS抑郁模型,连续3w每天随机选择一种。刺激如下:禁食、禁水20 h;禁水17 h;倾斜鼠笼(45℃)17 h;湿笼(100 g锯屑垫料中加入200 ml水)21 h;持续光照17 h;电击(30伏电压)足底5 sec;行为限制2 h;夹尾1 min;4℃冰水游泳(水深15 cm,大鼠的后足尖刚能触及桶底)5 min。每种应激给予3~4次,连续两天不出现相同应激,使大鼠不能预料刺激的发生。

1.2.2 药物干预方法 对照、CUS组正常群养。氟西汀低高剂量组于实验第22~49天给予氟西汀干预药(用蒸馏水配成质量浓度1L/g的溶液,5、10mg/kg,1次/d)腹腔注射,给药时间为每天下午14:00,对照、CUS组同时给予同等量生理盐水。在慢性应激结束(实验22d)以及治疗结束(实验49d)进行行为学测定。

1.2.3 抑郁行为学检测 ①糖水偏爱实验:参照文献^[6]的方法,单笼饲养大鼠,每笼放置2个饮水瓶。在实验第一天,2个饮水瓶装1%的蔗糖水;实验第二天,一个饮水瓶装纯水,另一饮水瓶装1%的蔗糖水;实验第三天的前23个小时内禁食、禁水之后1h给予大鼠一瓶1%的蔗糖水和一瓶纯水,放置顺序与前一次的相反。实验结束后计算动物的糖水消耗及糖水偏爱率(糖水偏爱率=糖水消耗量/总液体消耗

量×100%)。

②旷场实验(Open-field test)^[7]:旷场实验装置由不透明材料制成,大小为90cm*90cm*45cm,等分为25个等边方格。将大鼠置于中心方格内,观察大鼠在3min内水平运动次数(穿越外周格数和穿越中央格数)及垂直运动次数,其中,四只爪子均进入一格方可记录水平运动1次,两前爪腾空或攀附墙壁方可记录垂直运动1次。

1.2.4 TUNEL染色 进行行为学测定后,每组取6只大鼠快速取脑。进行振动切片厚度30 μm,具体方法参照文献^[8]。凋亡细胞结果判定:胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。计数方法:每只动物取4张切片,每张切片在海马CA1高倍视野(×200)下计算每个视野计数阳性细胞占总细胞的比例,取平均值代表该张切片细胞凋亡率。

1.2.5 脑组织Trek-1、GFAP mRNA表达 在进行行为学评估后,各组取6只大鼠麻醉后处死,取海马。用Trizol法提取总RNA,用反转录酶将mRNA反转录为cDNA。构建聚合酶体系;Taq酶催化,热循环:95℃预热5min,40个循环(94℃20s,退火20s,72℃30s)。采用荧光实时定量PCR法,将阈值循环数(ct)值与不同浓度标准品的对数值拟合作图,得出校正曲线;通过 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算目的基因与内参物(β -actin)Ct值的差值,表示目的基因的相对表达水平。Trek-1上游引物5'-TGCCAAAGTGAGGACACAT-3',下游引物5'-CTCTCCCACCTCTTCCTTCG-3';GFAP上游引物5'-TGGCCACCAGTAACATGCAA-3',下游引物5'-CAGTTGGCGGCGATAGTCAT-3'; β -actin上游引物5'-AGGGTGGTGACCTCATGG-3',下游引物5'-AGCAACTGAGGGCCTCTCTCTT-3'。

1.2.6 统计学方法 采用SPSS 21.0软件。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用one-way ANOVA, LSD-t分析数据。

2 结果

2.1 各组大鼠抑郁行为学变化

造模前各组抑郁行为学指标比较均无统计学意义($P>0.05$);造模后,CUS组、氟西汀低、高剂量组糖水消耗、糖水偏爱、垂直运动次数和水平运动次数明显低于对照组($P<0.01$);干预后,CUS组以上指标明显低于对照组($P<0.01$),氟西汀低、高剂量组经治疗后以上指标高于CUS组及干预前($P<0.01$ 或 <0.05),但仍低于对照组($P<0.01$ 或 <0.05)。见表1。

表1 各组大鼠造模前、后及干预后糖水消耗试验变化($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	造模前		造模后		干预后	
	糖水消耗(mL)	糖水偏爱(%)	糖水消耗(mL)	糖水偏爱(%)	糖水消耗(mL)	糖水偏爱(%)
对照组	15.13±2.98	82.98±9.31	14.33±2.75	83.33±7.15	14.08±3.01	84.12±8.97
CUS组	14.65±3.09	79.38±10.97	8.33±2.87**	63.75±8.96**	8.11±2.35**	65.31±9.76**
氟西汀低剂量组	15.28±3.97	81.39±10.57	8.01±2.08**	64.41±9.65**	9.94±3.82*** Δ	70.12±10.32*** Δ Δ
氟西汀高剂量组	14.86±3.87	80.95±11.79	8.24±3.15**	62.86±8.42**	11.32±2.24*** Δ	75.43±12.71*** Δ Δ

注:与对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$;与CUS组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与干预前比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;下同。

表2 各组大鼠造模前、后及干预后旷场消耗试验变化($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	旷场试验		造模后旷场试验		干预后旷场试验	
	垂直运动(次)	水平运动(次)	垂直运动(次)	水平运动(次)	垂直运动(次)	水平运动(次)
对照组	21.38±3.11	62.56±10.67	20.43±4.53	63.78±9.70	22.57±3.76	60.54±11.98
CUS组	22.89±4.31	63.41±11.95	6.85±3.98**	25.42±10.33**	7.31±2.59**	24.36±9.87**
氟西汀低剂量组	21.76±3.56	61.87±12.36	7.11±3.43**	26.71±11.96**	12.34±4.23*** Δ Δ Δ	35.66±13.56*** Δ Δ Δ
氟西汀高剂量组	20.65±4.70	62.61±11.92	7.43±4.21**	24.97±12.21**	17.65±3.66*** Δ Δ Δ	45.40±10.78*** Δ Δ Δ

2.2 各组大鼠海马CA1神经细胞凋亡率

CUS组细胞凋亡率明显高于对照组($P<0.01$)。氟西汀低、高剂量组大鼠的细胞凋亡率低于CUS组($P<0.01$),高于对照组($P<0.01$)。见表3。

表3 各组大鼠海马CA1神经细胞凋亡率变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

指标	组别			
	对照组	CUS组	氟西汀低剂量组	氟西汀高剂量组
细胞凋亡率(%)	5.21±2.57	40.25±4.78**	25.31±3.86*** Δ	20.69±3.64*** Δ

注:与对照组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$;与CUS组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;下同。

2.3 各组大鼠海马Trek-1、GFAPmRNA表达水平的比较

与对照组相比,CUS组Trek-1mRNA表达显著升高,GFAPmRNA表达下降($P<0.01$);氟西汀低、高剂量组Trek-1mRNA表达下降,GFAPmRNA表达升高,与CUS组相比有统计学意义,但与正常组相比仍有统计学意义($P<0.01$)。见表4。

表4 各组大鼠海马Trek-1、GFAPmRNA变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

指标	组别			
	对照组	CUS组	氟西汀低剂量组	氟西汀高剂量组
Trek-1	0.42±0.06	0.82±0.11**	0.63±0.07*** Δ	0.68±0.09*** Δ
GFAP	0.87±0.23	0.45±0.18**	0.58±0.22*** Δ	0.67±0.19*** Δ

3 讨 论

慢性不可预见性应激抑郁模型依据慢性、低水平、长期应激源可促进抑郁发生,其应激因子的多变性和不可预见性,已成为国内外学者探讨抑郁症的发病机制及抗抑郁剂作用机理广泛应用的动物模型^[9]。故本研究采用慢性不可预知性应激进行造模,在实验22d、49d时对各组大鼠进行行为学检测,发现造模后各组糖水消耗、糖水偏爱、垂直运动次数和水平运动次数明显降低,且经过氟西汀治疗后以

上症状明显改善,提示本研究成功地诱发了大鼠抑郁样行为。

TREK-1亚型双孔钾离子通道控制钾离子的流动,调节细胞的电位变化,参与多种疾病的病理生理过程,其复杂的门控特性及广泛存在的调控因素,决定了其在机体生理功能中的重要作用。最新的研究提示TREK-1与抑郁症关系密切。Veyssiere等发现^[10]TREK-1基因敲除小鼠表现出明显的抵抗抑郁表型,TREK-1的阻断剂Spadin可快速、有效地发挥抗抑郁效应,改善小鼠抑郁行为学指标。国内徐华^[11]应用新型TREK-1钾通道拮抗剂SID1900与经典SSRIs类抗抑郁药氟西汀对比研究发现SID1900可较早的显著改善大鼠的抑郁样行为。本研究发现CUS组Trek-1mRNA表达明显高于对照组,氟西汀治疗后Trek-1mRNA表达下降,说明慢性应激可导致Trek-1mRNA表达增高,而氟西汀能通过该通道改善抑郁行为,与既往研究一致^[12]。然而影响Trek-1表达抗抑郁机制还不明确。众所周知,星形胶质细胞缓冲K⁺、维持内环境稳态,再摄取谷氨酸,减轻兴奋性神经毒性的稳态调节功能有赖于其表达的钾离子通道使之具有较负的静息膜电位,为谷氨酸、GBAB、Na⁺/HCO₃⁻(NBC)等转运体提供电驱动力,进而发挥神经保护作用^[13]。至于是哪种类型的钾离子通道介导了星形胶质细胞维持这一较低的静息膜电位目前仍存在有争议。然而离体细胞研究证实在缺氧损伤的早期TREK-1在星形胶质细胞中的表达有上升趋势,随着缺血时间的增加,其表达又逐渐下降^[14],且TREK-1是为成熟海马星形胶质细胞的被动传导基础的主要成分^[15]。GFAP是星形胶质细胞的标志性蛋白,可以激活星形胶质细胞产生多种神经

营养因子,对突触重塑、神经元保护起到关键作用^[16]。临床研究显示抑郁症、精神分裂症、双向情感障碍等患者的脑内检测GFAP表达均下降^[17,18],动物实验中发现CUS海马GFAP表达水平下降^[19,20]。故我们认为Trek-1表达可能与海马GFAP表达复原发挥神经保护有关。本研究结果显示:CUS诱导抑郁大鼠海马区GFAP表达降低,细胞凋亡率升高,氟西汀干预后大鼠海马区GFAP表达升高,细胞凋亡率降低,与既往研究一致^[21],提示氟西汀可能通过改变海马Trek-1、GFAP表达,抑制细胞凋亡改善CUS大鼠抑郁症状。但仍需Trek-1拮抗剂进一步证实。

参 考 文 献

- Donato F, Borges Filho C, Giacomeli R, et al. Evidence for the Involvement of Potassium Channel Inhibition in the Antidepressant-Like Effects of Hesperidin in the Tail Suspension Test in Mice. *Journal of Medicinal Food*, 2015, 18(7): 818-823
- Ye D, Li Y, Zhang X, et al. TREK1 channel blockade induces an antidepressant-like response synergizing with 5-HT1A receptor signaling. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(12): 2426-2436
- Borsotto M, Veyssiere J, Moha Ou Maati H, et al. Targeting two-pore domain K(+) channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(3): 771-784
- Chen C, Wang L, Rong X, et al. Effects of fluoxetine on protein expression of potassium ion channels in the brain of chronic mild stress rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015, 5(1): 55-61
- Willner P, Moreau JL, Nielsen CK, et al. Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav*, 1996, 60(1): 129-134
- 王玉婷, 张逸, 白玫, 等. 慢性应激诱导的抑郁大鼠纹状体DRD1和miR-504的表达. *中国临床心理学杂志*, 2014, 22(4): 597-600
- Yue L, Zhao L, Liu H, et al. Adiponectin Protects against Glutamate-Induced Excitotoxicity via Activating SIRT1-Dependent PGC-1 α Expression in HT22 Hippocampal Neurons. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2957354
- 王一赫, 江虹, 李颖, 等. 不同时程温和应激对大鼠海马神经元、T淋巴细胞亚群的动态影响. *中国临床心理学杂志*, 2013, 21(5): 731-734
- Mahmoud R, Wainwright SR, Chaiton JA, et al. Ovarian hormones, but not fluoxetine, impart resilience within a chronic unpredictable stress model in middle-aged female rats. *Neuropharmacology*, 2016, 107: 278-293
- Veyssiere J, Moha Ou Maati H, Mazella J, et al. Retroinverso analogs of spadin display increased antidepressant effects. *Psychopharmacology(Berl)*, 2015, 232(3): 561-574
- 徐华, 祁鑫洋, 王立平, 等. TREK-1钾通道拮抗剂对抑郁模型大鼠行为学改善的影响. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2016, 25(7): 577-581
- Bogdan R, Fitzgibbon H, Woolverton WL, et al. 5-HTTLPR genotype and gender, but not chronic fluoxetine administration, are associated with cortical TREK1 protein expression in rhesus macaques. *Neurosci Lett*, 2011, 503(2): 83-86
- Palmfeldt J, Henningsen K, Eriksen SA, et al. Protein biomarkers of susceptibility and resilience to stress in a rat model of depression. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 74: 87-95
- Benesova J, Rusnakova V, Honsa P, et al. Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29725
- Zhou M, Xu G, Xie M, et al. TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 2009, 29(26): 8551-8564
- 沈忠飞, 王志坚, 潘巍巍, 等. 氟西汀调控CUMS抑郁大鼠海马突触重塑. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9): 1642-1647
- Oh DH, Son H, Hwang S, et al. Neuropathological abnormalities of astrocytes, GABAergic neurons, and pyramidal neurons in the dorsolateral prefrontal cortices of patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2012, 22(5): 330-338
- Kaur T, Manchanda S, Saini V, et al. Efficacy of Anti-Epileptic Drugs in the Treatment of Tumor and Its Associated Epilepsy: An in vitro Perspective. *Ann Neurosci*, 2016, 23(1): 33-43
- 叶缘苑, 王高华, 王惠玲, 等. 脑源性神经营养因子对慢性不可预见性温和应激大鼠行为和海马胶质纤维酸性蛋白表达的影响. *中华精神科杂志*, 2012, 45(5): 299-303
- Murad H, Ayuob N. Co-Administration of Pioglitazone Improves Fluoxetine's Antinociceptive, Neuroprotective, and Antidepressant Effects in Chronic Constriction Injury in Rats. *Pain Physician*, 2015, 18(6): 609-620
- Liu WX, Wang J, Xie ZM, et al. Regulation of glutamate transporter 1 via BDNF-TrkB signaling plays a role in the anti-apoptotic and antidepressant effects of ketamine in chronic unpredictable stress model of depression. *Psychopharmacology(Berl)*, 2016, 233(3): 405-415

(收稿日期:2017-04-20)