

论著·基础

地卓西平马来酸盐对抑郁大鼠行为学和前额叶 BDNF 表达的影响

高振勇 杨平* 杜向东

(苏州市广济医院 江苏 苏州 215008)

* 通信作者: 杨平, E-mail: 928yangping@163.com)

【摘要】 目的 观察地卓西平马来酸盐(MK-801)预处理对利血平诱导的抑郁模型大鼠抑郁行为的改善作用及大脑前额叶脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。方法 采用随机数字表法将32只成年雄性SD大鼠分为4组:对照组、利血平模型组、MK-801+利血平组和MK-801组,每组8只。MK-801+利血平组和MK-801组预先给予腹腔注射MK-801(0.3 mg/kg),对照组和利血平模型组腹腔注射相应体积的生理盐水。30 min后,利血平模型组和MK-801+利血平组腹腔注射利血平(4 mg/kg),对照组和MK-801组腹腔注射相同体积的乙酸溶剂。注射利血平48 h后利用强迫游泳实验观察大鼠的抑郁样行为表现,并在行为实验完成后处死大鼠,以酶联免疫吸附实验(ELISA)检测大鼠前额叶BDNF的表达水平。结果 在强迫游泳实验中,利血平模型组强迫游泳不动时间 $[(49.38 \pm 7.85) \text{ s}]$ 长于对照组 $[(15.59 \pm 5.43) \text{ s}]$,差异有统计学意义($t=11.91, P<0.01$);MK-801+利血平组强迫游泳不动时间 $[(12.32 \pm 4.25) \text{ s}]$ 短于利血平模型组,差异有统计学意义($t=13.06, P<0.05$)。ELISA结果显示,利血平模型组前额叶BDNF表达水平 $[(10.09 \pm 0.88) \text{ ng/mL}]$ 低于对照组 $[(13.29 \pm 1.10) \text{ ng/mL}]$,差异有统计学意义($t=6.44, P<0.01$);MK-801+利血平组大鼠前额叶的BDNF表达水平 $[(12.56 \pm 1.83) \text{ ng/mL}]$ 高于利血平模型组,差异有统计学意义($t=3.44, P<0.05$)。结论 MK-801可改善大鼠的抑郁样行为,其机制可能与调节脑内BDNF的表达有关。

【关键词】 利血平; 抑郁症; 地卓西平马来酸盐; 前额叶; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R749.4

文献标识码: A

doi: 10.11886/j.issn.1007-3256.2016.06.005

Effect of dizocilpine maleate on behavior and brain - derived neurotrophic factor expressing in prefrontal cortex of depressive rats

Gao Zhenyong, Yang Ping*, Du Xiangdong

(Suzhou Guangji Hospital, Suzhou 215008, China)

* Corresponding author: Yang Ping, E-mail: 928yangping@163.com)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of dizocilpine maleate (MK-801) on the behavior and the expression of brain - derived neurotrophic factor (BDNF) on prefrontal cortex of reserpine induced depression rats. **Methods** 32 adult male SD rats were randomly divided into four groups ($n=8$), control group, reserpine group, MK-801+reserpine group and MK-801 group. MK-801+reserpine group and MK-801 group were pretreated with MK-801 (0.3 mg/kg) by peritoneal injection while control group and reserpine group were pretreated with same volume normal saline. After 30 minutes, reserpine group and MK-801+reserpine group were administrated with reserpine (4 mg/kg) by peritoneal injection, while control group and MK-801 group were administrated with the same volume acetic acid. The forced swim test was given at 48 hours after reserpine administration to monitor the depressive - like behaviors. All rats were executed immediately after the behavioral test, and the expression of BDNF on prefrontal cortex were measured using enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In forced swim test, the immobility time of reserpine group $[(49.38 \pm 7.85) \text{ s}]$ was significantly longer than that of control group $[(15.59 \pm 5.43) \text{ s}]$ [$t=11.91, P<0.01$], while the immobility time of the MK-801+reserpine group $[(12.32 \pm 4.25) \text{ s}]$ was significantly shorter than that of reserpine group ($t=13.06, P<0.05$). The expression of BDNF in prefrontal cortex of reserpine group $[(10.09 \pm 0.88) \text{ ng/mL}]$ was significantly lower compared with control group $[(13.29 \pm 1.10) \text{ ng/mL}]$ [$t=6.44, P<0.01$], and the expression of BDNF in prefrontal cortex of MK-801+reserpine group $[(12.56 \pm 1.83) \text{ ng/mL}]$ was significantly higher than reserpine group ($t=3.44, P<0.05$). **Conclusion** MK-801 could improve depression behavior of rats, and its mechanism may be related to the regulation of the expression of BDNF in the brain.

【Key words】 Reserpine; Depression; Dizocilpine maleate; Prefrontal cortex; BDNF

项目基金: 苏州市"科教兴卫"青年科技项目(KJXW2013034);
苏州市精神疾病临床医学中心(SZZX201509)

抑郁症是一种常见的以情感低落为主要表现的精神疾病,全球多达20%的人在一生中的某一时刻

有过一次抑郁发作^[1]。当抑郁发作变为慢性或反复发作并严重损害个体的机能时就称为重度抑郁障碍(Major depressive disorder, MDD),其主要临床症状有快感缺失、意志活动减退、思维迟缓以及自我关注增强^[2]。有学者对传统精神病理的单胺类递质学说提出了质疑,他们认为谷氨酸及其受体在许多精神心理障碍的发生中起着关键作用,其他神经递质如去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)等也是在谷氨酸异常的基础上发生变化的^[3]。调节N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体通道活性具有治疗或辅助治疗抑郁的效应,NMDA受体拮抗剂地卓西平(MK-801)单独应用或与经典抗抑郁药物合用都有抗抑郁作用^[4-6]。许多证据显示脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)与情感障碍的病理生理学机制有关^[7-8]。研究发现,抑郁症患者海马部位及前额叶皮层部位BDNF水平明显降低^[9],脑卒中后抑郁(Post-stroke Depression, PSD)大鼠额前皮质BDNF mRNA表达减少也可能与PSD发病机制相关^[10]。因此本研究通过利血平建立抑郁症大鼠模型,并应用NMDA受体拮抗剂MK-801进行干预,观察抑郁模型大鼠行为学和前额叶BDNF的变化,由此探讨MK-801的抗抑郁作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和饲养

清洁级成年健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量200~260g,由汕头大学医学院实验动物中心提供。实验前大鼠在动物房饲养一周,每笼饲养4只,12h/12h昼夜交替,环境温度(24±1)℃,大鼠自由进食、饮水。饲养期间每天触摸大鼠2h使大鼠适应实验人员的操作。实验动物的操作和处理过程均遵守实验动物管理条例的相关规定。

1.1.2 仪器和试剂

强迫游泳视频分析系统(上海移数信息科技有限公司);利血平溶液(Sigma公司),溶于10%的乙酸溶液(pH 3.5),配成2mg/mL的利血平溶液;MK-801溶液(Sigma公司),溶于生理盐水中,配成质量浓度为0.15mg/mL的MK-801溶液;大鼠脑源性神经生长因子酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司EK0308);RIPA裂解液(强)、

PMSF(江苏碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和给药

采用随机数字表法将32只大鼠分为4组,即对照组、利血平模型组、MK-801+利血平组和MK-801组,每组8只。MK-801+利血平组和MK-801组按2mL/kg剂量腹腔注射0.15mg/mL的MK-801溶液进行预处理,对照组和利血平模型组腹腔注射相同体积的生理盐水。30min后,利血平模型组和MK-801+利血平组均按2mL/kg剂量腹腔注射2mg/mL利血平溶液,对照组和MK-801组腹腔注射相同体积的乙酸溶剂。

1.2.2 行为学检测

在腹腔注射利血平溶液后48h对各组大鼠进行强迫游泳实验。强迫游泳实验由4个直径30cm、高65cm的树脂玻璃筒组成,水面距离水筒上缘14cm,水温控制在(25±1)℃,将水筒放置于安静、避光的观察室中。测试前一天先将大鼠放入水中预游泳15min,进行适应性训练,24h后再次游泳5min,录像并分析大鼠在5min游泳时间内的不动时间,以此作为判断大鼠抑郁严重程度的指标。将不动时间定义为大鼠四肢没有运动或大鼠为了漂浮在水面上而仅有后肢轻微的运动。每个树脂玻璃筒检测完一只大鼠后需彻底清洁并换水再检测下一只大鼠。

1.2.3 BDNF表达水平检测

行为学检测完毕后,将大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠溶液(2.3mL/kg)麻醉后断头取脑,分离前额叶组织。检测前溶解RIPA裂解液,混匀,取适量的裂解液,在使用前数分钟内加入PMSF,使PMSF的最终浓度为1mmol/L。按照质量体积比(g/mL)1:10加入裂解液,匀浆棒研磨前额叶组织,直至充分裂解,然后放入4℃离心机,离心半径20.5cm,14000r/min,离心5min,取上清液,应用大鼠脑源性神经生长因子ELISA试剂盒检测前额叶BDNF的表达。

1.3 统计方法

应用SPSS 17.0进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。各组之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较前进行方差齐性检验,满足方差齐性采用LSD检验,方差不齐则采用Dunnett's T3检

验。检验水准 $\alpha = 0.05$

2 结 果

2.1 MK-801 对利血平诱导的抑郁模型大鼠强迫游泳不动时间的影响

四组大鼠强迫游泳不动时间差异有统计学意义 ($F = 81.365, P < 0.01$)。组间两两比较经 LSD 检验显示,与对照组相比,利血平模型组强迫游泳不动时间在利血平注射后 48 h 明显增多,差异有统计学意义 ($t = 11.91, P < 0.01$);与利血平模型组相比, MK-801 + 利血平组强迫游泳不动时间在利血平注射后 48 h 明显减少,差异有统计学意义 ($t = 13.06, P < 0.05$)。见表 1。

2.2 MK-801 对利血平诱导的抑郁模型大鼠前额叶 BDNF 表达的影响

四组大鼠前额叶 BDNF 的表达差异有统计学意义 ($F = 16.963, P < 0.01$)。组间两两比较经 Dunnett's T3 检验显示,利血平模型组大鼠前额叶 BDNF 表达低于对照组,差异有统计学意义 ($t = 6.44, P < 0.01$),而 MK-801 + 利血平组大鼠前额叶的 BDNF 表达高于利血平模型组,差异有统计学意义 ($t = 3.44, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 四组大鼠强迫游泳不动时间及 BDNF 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	不动时间 (s)	前额叶 BDNF 浓度 (ng/mL)
对照组 ($n = 8$)	15.59 ± 5.43	13.29 ± 1.10
利血平模型组 ($n = 8$)	49.38 ± 7.85 ^a	10.09 ± 0.88 ^a
MK-801 + 利血平组 ($n = 8$)	12.32 ± 4.25 ^b	12.56 ± 1.83 ^b
MK-801 组 ($n = 8$)	12.09 ± 4.43	15.51 ± 2.03
<i>F</i>	81.365	16.963
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与利血平模型组比较,^b $P < 0.05$

3 讨 论

20 世纪 50 年代,利血平被广泛应用于高血压病的治疗,但临床研究发现长期应用利血平后一些患者会出现抑郁症状。由此出现的由利血平诱导的行为性抑郁动物模型被广泛应用于抑郁症发病机制的研究和抗抑郁药物的研发^[11-12]。强迫游泳实验是评价抗抑郁药作用常用的行为学检测方法,最早由 Porsolt 等^[13]描述,并由 Weiss 等^[14]改进用来检测啮齿类动物的抑郁行为表现。实验中,大鼠或小

鼠被迫在一个局限的空间内游泳,它们首先试图逃跑,随后处于一种漂浮不动状态,放弃逃脱的希望,即行为绝望。通过计算动物在强迫游泳中的不动时间作为判断动物抑郁行为严重程度的指标。本研究结果显示,在腹腔注射利血平 48 h 后,利血平模型组大鼠强迫游泳不动时间多于对照组 ($P < 0.01$),表明利血平模型组大鼠处于行为绝望状态。然而,给予 0.3 mg/kg 的 MK-801 预处理后的利血平模型大鼠的强迫游泳不动时间明显减少,表明 MK-801 能有效改善利血平诱导的抑郁样行为。

BDNF 是神经营养因子家庭的重要成员,对中枢和外周神经元的存活、维持和生长起重要作用^[15]。它能增强突触联系,影响神经元的可塑性和神经递质的合成,并且与长时程增强效应 (LTP) 及学习、记忆功能有关^[16]。氯胺酮是 NMDA 受体苯环己哌啶位点的一种非竞争性拮抗剂,研究表明,对抑郁症患者给予单剂量的氯胺酮能产生抗抑郁作用^[17]。有研究提示氯胺酮及其他 NMDA 受体拮抗剂在大鼠模型中的快速抗抑郁作用依赖于 BDNF 的快速合成,其机制可能是通过灭活真核延伸因子 2 (eEF2) 激酶 (也被称为钙调蛋白激酶 III),从而导致 eEF2 的磷酸化降低和 BDNF 翻译的去抑制^[18]。另外,也有研究显示氯胺酮与米帕明合用能显著提高前额皮质、海马和杏仁核中环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 和 BDNF 的水平,海马和杏仁核中蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的磷酸化以及前额皮质中蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的磷酸化^[19]。在本研究中,利血平模型组大鼠前额叶 BDNF 的表达是下调的,而应用 MK-801 预处理能抑制 BDNF 的下调,进一步表明 MK-801 改善抑郁大鼠的抑郁行为表现可能与调节脑内 BDNF 的表达有关。但本研究也存在一些缺陷和不足,因作为抑郁行为检测方法的强迫游泳实验本身也可引起大鼠产生抑郁行为,且本实验未设置未经任何处理的强迫游泳组,因此不能排除强迫游泳本身对实验的干扰,在今后的研究中还需进一步完善。

参考文献

- [1] Kessler RC, Berglund P, Demler O, et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication [J]. Arch Gen Psychiatry, 2005, 62(6): 593-602.
- [2] Thase ME. Bipolar depression: issues in diagnosis and treatment [J]. Harv Rev Psychiatry, 2005, 13(5): 257-271.
- [3] Moghaddam B. Stress activation of glutamate neurotransmission in

- the pre - frontal cortex: implications for dopamine - associated psychiatric disorders[J]. *Biol Psychiatry* ,2002 ,51(10) : 775 -787.
- [4] Padovan CM , Guimarães FS. Antidepressant - like effects of NMDA - receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav* ,2004 ,77(1) : 15 -19.
- [5] Meloni D ,Gambarana C ,De Montis MG ,et al. Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav* ,1993 ,46(2) : 423 -426.
- [6] Skolnick P , Miller R , Young A , et al. Chronic treatment with 1 -aminocyclopropanecarboxylic acid desensitizes behavioral responses to compounds acting at the N - methyl - D - aspartate receptor complex [J]. *Psychopharmacology (Berl)* ,1992 ,107(4) : 489 -496.
- [7] Hashimoto K , Shimizu E , Iyo M. Critical role of brain - derived neurotrophic factor in mood disorders [J]. *Brain Res Brain Res Rev* ,2004 ,45(2) : 104 -114.
- [8] Hashimoto K. Brain - derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: a historical overview and future directions [J]. *Psychiatry Clin Neurosci* ,2010 ,64(4) : 341 -357.
- [9] Taliaz D ,Stall N ,Dar DE , et al. Knockdown of brain - derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis [J]. *Mol Psychiatry* ,2010 ,15(1) : 80 -92.
- [10] 李云,郭旭,李永刚,等. 脑卒中后抑郁大鼠额前皮质脑源性神经营养因子及酪氨酸激酶受体 B 表达的变化 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志* ,2013 ,22(1) : 6 -8.
- [11] Leith NJ ,Barrett RJ. Effect of chronic amphetamine or reserpine on self stimulation responding: animal model of depression [J]. *Psychopharmacology (Berl)* ,1980 ,72(1) : 9 -15.
- [12] Hoffman BJ. Expression cloning of a serotonin transporter: a new way to study antidepressant drugs [J]. *Pharmacopsychiatry* ,1994 ,27(1) : 16 -22.
- [13] Porsolt RD , Le Pichon M , Jalfre M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments [J]. *Nature* ,1977 ,266(5604) : 730 -732.
- [14] Weiss JM , Cierpial MA , West CH. Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression [J]. *Pharmacol Biochem Behav* ,1998 ,61(1) : 49 -66.
- [15] Lewin GR ,Barde YA. Physiology of the neurotrophins [J]. *Annu Rev Neurosci* ,1996 ,19: 289 -317.
- [16] Murua VS , Gomez RA , Andrea ME , et al. Shuttle - box deficits induced by chronic variable stress: reversal by imipramine administration [J]. *Pharmacol Biochem Behav* ,1991 ,38(1) : 125 -130.
- [17] Berman RM ,Cappiello A ,Anand A , et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients [J]. *Biol Psychiatry* ,2000 ,47(4) : 351 -354.
- [18] Autry AE ,Adachi M ,Nosyreva E , et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses [J]. *Nature* ,2011 ,475(7354) : 91 -95.
- [19] Réus GZ ,Stringari RB ,Ribeiro KF , et al. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant - like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain [J]. *Behav Brain Res* ,2011 ,221(1) : 166 -171.

(收稿日期:2016 - 11 - 15)

(本文编辑: 陈 霞)