

丙戊酸钠抗抑郁作用涉及改善海马 NET 和 5-HTT 表达

费慧芝¹,胡小娅²,邱红梅²,刘丹³,周岐新^{2*}

(¹重庆三峡医药高等专科学校药理学教研室,万州 404100; ²重庆医科大学重庆生物化学和分子药理学重点实验室,重庆 400016; ³重庆市中山医院,重庆 400016)

摘要 采用孤养结合慢性不可预见性温和刺激(CUMS)方式建立抑郁模型,探讨丙戊酸钠抗抑郁作用与改善海马去甲肾上腺素转运体(norepinephrine transporter,NET)、5-羟色胺转运体(serotonin transporter,5-HTT)表达之间的关系。60只雄性SD大鼠随机分为对照组(NG)、模型组(MG)、丙戊酸钠对照组(VNG)及丙戊酸钠模型组(VMG)。通过开场实验、强迫游泳试验评价大鼠抑郁行为。通过生物化学法测定血清丙二醛(MDA)含量及超氧化物酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性;以实时定量RT-PCR法及Western blot分析丙戊酸钠对大鼠海马NET、5-HTT mRNA及蛋白表达的影响。实验结果表明:CUMS致模型组大鼠活动减少,不动时间明显增加,MDA含量升高,SOD、CAT活性下降,海马NET mRNA及蛋白表达显著升高,5-HTT mRNA及蛋白表达明显降低,而丙戊酸钠干预可明显阻遏以上变化,但对对照组大鼠无显著影响。以上结果提示,丙戊酸钠抗抑郁作用可能涉及改善CUMS大鼠海马NET及5-HTT mRNA及蛋白的表达。

关键词 慢性不可预见性温和刺激(CUMS);抗抑郁;丙戊酸钠;去甲肾上腺素转运体;5-羟色胺转运体

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)04-0474-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160414

引用本文 费慧芝,胡小娅,邱红梅,等. 丙戊酸钠抗抑郁作用涉及改善海马NET和5-HTT表达[J]. 中国药科大学学报,2016,47(4):474-478.

Cite this article as: FEI Huizhi, HU Xiaoya, QIU Hongmei, et al. Improvement of NET,5-HTT expression involved in the anti-depressive effect of valproate[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(4):474-478.

Improvement of NET and 5-HTT expression involved in the anti-depressive effect of valproate

FEI Huizhi¹, HU Xiaoya², QIU Hongmei², LIU Dan³, ZHOU Qixin^{2*}

¹Department of Pharmacology, Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou 404100; ²Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; ³Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400016, China

Abstract This study aimed at investigating the correlations between antidepressive effect of valproate and improvements of NET and 5-HTT expression in depressive rats leaded by chronic mild unpredicted stress (CUMS) with solitary condition. Sixty male SD rats were divided into normal group (NG), model group (MG), valproate treated-normal group (VNG), and valproate treated-model group (VMG), randomly. The changes of depressive behaviors were evaluated by the open-field test and force swimming test. The contents of MDA, activities of SOD and CAT in serum, the mRNA and protein expression of NET, 5-HTT in hippocampus were determined by biochemical methods, Real-time PCR and Western Blot, respectively. Results showed that CUMS can significantly decrease the activities in open-field test, SOD and CAT activities in serum, expression of 5-HTT in hippocampus, and obviously increase the immobility time in force swimming test, the level of MDA and expression of NET. The treatment of valproate obviously improved the changes induced by CUMS. However, the treatment of valproate had no significant influences on behaviors of NG rats. So, it revealed that improvements of the mRNA and protein expression of NET, 5-HTT may be involved in the antidepressive effect of valproate.

Key words chronic mild unpredicted stress (CUMS); antidepressive; valproate; norepinephrine transporter; serotonin transporter

This study was supported by the National Science Foundation of China (No. 31400881)

抑郁症是一种普遍的情感障碍性疾病,其主要的临床特征为焦虑、食欲减退、失眠,严重自我否定,甚至有自杀倾向,据世界卫生组织调查,每年有 100 万人因抑郁症自杀身亡,全球患病人数更是达到 3.5 亿人,已严重危及人类健康^[1]。抑郁症发病机制复杂,核心机制包括氧化应激学说、脑神经源营养因子学说、单胺递质学说、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进等。大量研究表明,氧化/抗氧化应激系统失衡与抑郁症发病有密切关系,科学研究也证明,抑郁症发病与去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)等中枢单胺类递质减少有关,认为可能涉及 NE、5-HT 的合成、转运及作用受体等^[2-3]。帕罗西汀、瑞波西汀等传统抗抑郁药物是通过不同途径增加突触间隙中 5-HT 和 NE 的含量来发挥药物作用。近年研究发现丙戊酸可单独用于轻中度抑郁症的治疗,也可与传统抗抑郁药物帕罗西汀、氟西汀等合用,有协同抗抑郁作用^[4-5]。而目前关于丙戊酸钠抗抑郁作用的机制研究较少,作用机制是否也与改善去甲肾上腺素转运体(NET)、5-羟色胺转运体(5-HTT)表达有关尚不明确。因而,本实验采用孤养联合慢性不可预见性温和刺激(CUMS)建立实验性抑郁大鼠模型,通过 RT-PCR 及 Western blot 考察 CUMS 大鼠海马 NET、5-HTT 的 mRNA 及蛋白质的表达,探讨丙戊酸钠抗抑郁作用机制是否涉及改善 NET、5-HTT 表达。

1 材 料

1.1 药品与试剂

丙戊酸钠原料药(武汉圣天宇科技公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂公司)溶液作溶剂溶解,配成 30 mg/mL 的混悬液,4 ℃避光保存。SOD、MDA 和 CAT 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);5-HTT、NET 抗体(美国 Millipore 公司);PCR 扩增引物(上海鼎安生物技术有限公司);TRNzol 总 RNA 提取、RNAsstore 组织保存液、cDNA 第一链合成试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。

1.2 仪 器

实时定量 RT-PCR 仪、微量核酸定位仪(美国

Bio-Rad 公司);电泳仪(北京六一仪器厂);低温离心机(美国 Sigma 公司)。

1.3 动 物

60 只清洁级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,8 周龄。动物实验室、实验动物及饲料均由重庆医科大学动物实验中心提供,实验动物医学许可证号为 SCXK(渝)2010-0001。动物实验操作严格参照动物伦理规范执行。

2 方 法

2.1 建模及分组

采用孤养结合 CUMS 建立大鼠实验性抑郁模型,建模周期为 28 d。雄性 SD 大鼠 60 只,适应性喂养 1 周后,采用随机数表法进行随机编号,分为对照组(NG)、丙戊酸钠对照组(VNG)、模型组(MG)、丙戊酸钠模型组(VMG)。对照组大鼠每笼 5 只,模型组大鼠每笼 1 只。每日早晨刺激前 1 h 灌胃给药,丙戊酸钠组灌胃给药量为 300 mg/kg,对照组给予同体积的 0.5% CMC-Na 溶剂。每天 9:00 随机给予建模组一种以下刺激方式(4 d 内不重复):4 ℃冰水游泳 5 min,电击 45 V 3 min,45 ℃热环境 5 min,湿垫料 24 h,倾斜鼠笼 45°并禁水 24 h,夹尾 1 min,间歇照明 18 h(光/暗周期 1 h/1 h,时间为 17:00–7:00),通宵照明,120 Db 噪音 2 h,禁食禁水 24 h。

2.2 开场实验

自制实验敞箱(100 cm × 100 cm × 40 cm),内侧及底部漆成黑色,底部分为 5 × 5 的 25 个小方格。实验时,将大鼠置于中央格,观察并记录 5 min 内大鼠四爪均进入方格的穿越格数(水平活动得分)、后肢直立次数(垂直活动得分),每次观测后,用酒精清洁木箱底部及内侧面,待酒精挥发后再进行下一次实验。

2.3 强迫游泳实验

实验时将大鼠置于一直径 100 cm,高 40 cm 的圆形盛水水槽中,水深为 30 cm,水温(22 ± 3)℃,使大鼠直立无法触及水槽底部,跳跃无法跳出水槽。计时 6 min,观察并记录大鼠总 6 min 内的不

动时间(静止不动及踩假水的时间)。

2.4 生物化学法

实验结束后,每组随机抽取大鼠 7 只,断头取血,静置后离心,取上清液,按照试剂盒的要求取样测定,分别采用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 水平,WST-1 法测定 SOD 活性,紫外-可见分光法测定 CAT 活性,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,再按规定公式分别计算 MDA 含量及 CAT、SOD 活性。

2.5 RT-PCR

由上海鼎安生物技术有限公司设计合成引物序列和扩增片段:β-actin 引物序列长度 100 bp,5'-CG-TAAAGACCTCTATGCCAAC-3',下游 5'-TAGGAGC-CAGGGCAGTAATC-3';NET 扩增片段长度 123bp,上游 5'-CGCAGTGACAGGCCCTGAGA-3',下游 5'-CCACCTGGCGATTACAGAA-3';5-HTT 扩增片段长度 205 bp,上游 5'-CTGCCAAGGGAGGAGAAGAG-3',下游 5'-GGATCAGAATCGGCTGAGGTT-3'。建模完成后,每组随机选取 4 只大鼠,断头,分离海马,取海马置于 RNA store(100 mg:1 mL)液中冻存备用。海马总 RNA 按 TRNzol 总 RNA 提取剂试剂盒说明书提取,取总 RNA 1 μg 在反应条件(42 ℃ 反应 20 min→99 ℃ 反应 5 min→4 ℃ 反应 5 min)下进行逆转录合成 cDNA,以反应产物为模板,用 NET、5-HTT、β-actin 引物进行 PCR 扩增反应。参照试剂盒说明书进行荧光定量聚合酶链反应,用^{△△}CT 法进行相对定量,与内参比较计算 NET、5-HTT mRNA 相对表达量。

2.6 Western blot

取海马组织,冰上匀浆,提取其总蛋白,酶标仪测定蛋白质浓度。过程简述如下:电泳,转膜,封闭 1~2 h,先后加入一抗、二抗进行免疫应答反应,洗膜、压片后进行凝胶图象分析:比较分析 β-actin、NET、5-HTT 条带的灰度值,计算 NET、5-HTT 蛋白的相对表达量。

2.7 统计方法

统计软件使用 SPSS 19.0 软件,分析方法采用单因素方差分析,所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 丙戊酸钠对 CUMS 大鼠行为学的影响

如表 1 所示, MG 组大鼠开场实验水平活动和

垂直活动得分较 NG 组显著降低($P < 0.01, P < 0.05$),强迫游泳实验中不动时间明显增加($P < 0.01$),而丙戊酸钠干预能够有效阻遏 CUMS 诱导大鼠产生抑郁行为($P < 0.05$),对正常大鼠无明显影响。

Table 1 Effect of valproate on rats behaviors ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Group	Vertical movement score	Horizontal movement score	Immobility time in 6 min/s
NG	83.63 ± 28.88	18.5 ± 7.79	151.43 ± 15.23
MG	36.80 ± 25.50 ^{**}	10 ± 4.24 [*]	219.44 ± 19.12 ^{**}
VNG	72.36 ± 27.7	16.91 ± 7.45	155.83 ± 7.53
VMG	70.71 ± 31.96 [#]	17.43 ± 7.87 [#]	137.16 ± 15.22 ^{##}

^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs NG group; ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$ vs MG group

NG: Normal group; MG: Model group; VNG: Valproate treated-normal group; VMG: Valproate treated-model group

3.2 丙戊酸钠对大鼠血清 MDA 含量、SOD 及 CAT 活力变化

相较于 NG 组,CUMS 致 MG 组大鼠血液的 MDA 含量明显升高($P < 0.05$),SOD、CAT 活力明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),而 VMG 组与 MG 相比,MDA 含量显著下降($P < 0.05$),SOD、CAT 活力明显升高($P < 0.01, P < 0.05$),而 VMG 与 NG 相比,无明显变化。由此可见,CUMS 可致氧化应激失衡,而丙戊酸钠可以遏制这种变化但对正常大鼠无明显影响。

Table 2 Effect of valproate on the level of malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in serum ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Group	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	CAT/(U/mL)
NG	4.26 ± 0.14	22.08 ± 0.32	2.60 ± 0.19
MG	4.86 ± 0.15 [*]	20.31 ± 0.72 ^{**}	1.37 ± 0.11 [*]
VNG	4.01 ± 0.28	22.35 ± 0.24	1.53 ± 0.24
VMG	4.09 ± 0.34 [#]	22.34 ± 0.44 ^{##}	2.30 ± 0.43 [#]

^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ vs NG group; ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$ vs MG group

3.3 大鼠海马 NET、5-HTT mRNA 表达

由表 3 可见, MG 组相比于 NG 组, 大鼠海马 NET mRNA 表达显著升高($P < 0.05$); 5-HTT mRNA 表达明显降低($P < 0.05$), 使用丙戊酸钠干预能够阻遏这种改变, 但对正常大鼠无明显影响。

3.4 大鼠海马 NET、5-HTT 蛋白表达

如图 1 及图 2 所示, 空白模型组大鼠海马 NET 蛋白表达比对照组 NET 蛋白明显升高($P <$

0.05),与之相反 MG 组大鼠 5-HTT 蛋白表达与 NG 组相比显著降低($P < 0.01$),丙戊酸钠处理能够有效阻遏 NET 的升高及 5-HTT 降低,但对正常组大鼠 NET、5-HTT 表达无影响。

Table 3 Effect of valprate on the mRNA expression of norepinephrine transporter (NET) and serotonin transporter (5-HTT) in hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Group	NET mRNA expression	5-HTT mRNA expression
NG	1.04 ± 0.34	1.12 ± 0.54
MG	3.64 ± 1.37 *	0.12 ± 0.06 *
VNG	1.14 ± 0.27	1.15 ± 0.07
VMG	1.58 ± 1.02	0.40 ± 0.11 #

* $P < 0.05$ vs NG group; # $P < 0.05$ vs MG group

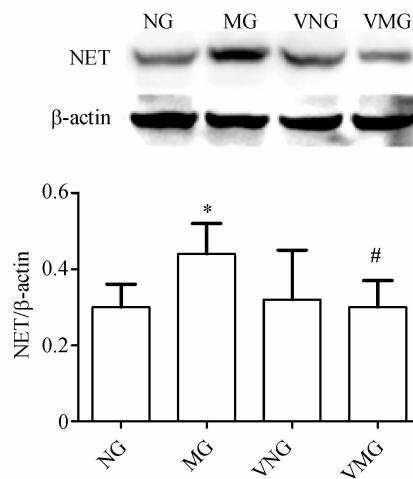


Figure 1 Expression of NET proteins in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

* $P < 0.05$ vs NG group; # $P < 0.05$ vs MG group

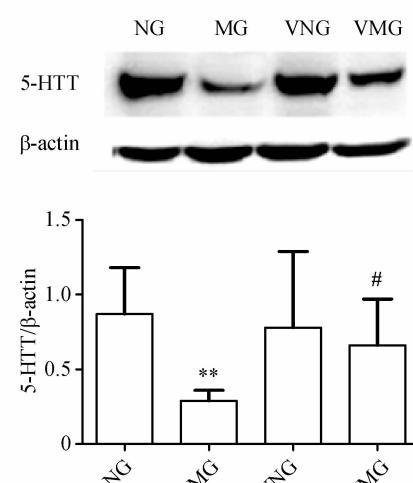


Figure 2 Expression of 5-HTT proteins in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

** $P < 0.01$ vs NG group; # $P < 0.05$ vs MG group

4 讨 论

丙戊酸钠是临床广泛应用的抗癫痫药,也是一种心境稳定剂,对双向情感障碍有显著疗效。而近期有研究发现丙戊酸钠有改善抑郁行为的作用,提高抗抑郁药物的抗抑郁作用效果,可辅助其他抗抑郁药物治疗难治性抑郁及双向抑郁^[6]。本实验以 CUMS 建立抑郁模型,研究丙戊酸钠的抗抑郁作用可能涉及的作用机制。

大量研究发现,机体发生精神障碍性疾病重要原因之一是氧化应激损伤致体内氧自由基升高,且抑郁症的发病与诱导和激活细胞氧化和硝化应激通路有关^[7]。MDA 是脂质氧化的最终产物,而 SOD、CAT 是体内自由基的清道夫。在很多临床抑郁症患者血清中发现 MDA 含量明显升高,SOD、CAT 含量下降,表明抑郁症的发病可能与氧化应激失衡有关。本课题组前期研究也发现氧化应激可损伤海马神经细胞,在 CUMS 大鼠体内,血清 MDA 含量明显升高,而 SOD、CAT 活性显著降低,海马神经细胞出现明显病理损伤,而抗抑郁药物帕罗西汀、瑞波西汀对氧化/抗氧化失衡有明显逆转作用^[8-9]。本实验结果表明,丙戊酸钠能够抑制 CUMS 大鼠的氧化应激反应,其抗抑郁作用可能涉及改善氧化/抗氧化应激失衡。

单胺学说是最经典的抑郁症发病机制之一。该学说认为突触间隙内 NE、5-HT 等中枢单胺递质含量减少是抑郁症发病的主要原因。目前很多抗抑郁药物,如瑞波西汀、帕罗西汀、文拉法辛等,通过阻断 NET、5-HTT,抑制 5-HT、NA 的再摄取而发挥药物作用。研究表明,CUMS 模型小鼠体内 5-HTT 的表达明显下降^[10],而社交障碍模型的大鼠体内海马、杏仁核、蓝斑核、前额叶等部位 NET mRNA 及蛋白表达水平明显升高^[11]。本课题组前期研究显示 CUMS 致抑郁大鼠海马 5-HTT 的 mRNA 及蛋白表达下降,而海马 NET 的 mRNA 及蛋白表达升高,蓝斑核、脑桥的 NET 的表达降低,使用瑞波西汀、文拉法辛等可以逆转这种变化^[12-13]。本次试验结果显示 CUMS 致抑郁大鼠海马 5-HTT 的 mRNA 及蛋白表达下降,而海马 NET 的 mRNA 及蛋白表达升高,使用丙戊酸钠可以逆转 CUMS 致抑郁大鼠海马 NET 及 5-HTT 的表达。提示丙戊酸钠抗抑郁作用可能涉及逆转

NET 及 5-HTT 的表达。

近年来的研究认为,突触间隙内单胺递质减少可能不仅与转运体作用相关,还与单胺递质的合成代谢等有关。酪氨酸羟化酶(TH)、色氨酸羟化酶(TPH)分别是单胺递质 NE 及 5-HT 合成的限速酶。实验研究也发现在 CUS 模型大鼠海马中 TH 和 TPH 的 mRNA 及蛋白表达水平明显下降^[14],使用文拉法辛干预后 TH、TPH 明显升高^[15]。提示抑郁症的发病可能与抑制单胺递质 5-HT、NE 的合成有关,而丙戊酸钠抗抑郁作用是否与单胺递质的合成、代谢等有关还需进一步研究。

本实验通过建立 CUMS 大鼠抑郁模型,研究丙戊酸钠抗抑郁作用可能涉及的机制,结果显示 CUMS 可致大鼠活动减少,氧化应激失衡,CUMS 大鼠海马 NET 表达升高,而 5-HTT 表达下降,而丙戊酸钠干预能够改善氧化应激失衡及逆转 5-HTT、NET 的 mRNA 及蛋白表达水平,提示丙戊酸钠抗抑郁作用可能与改善氧化/抗氧化应激失衡,阻遏 5-HTT、NET 的 mRNA 及蛋白表达水平有关。其作用机制是否涉及更多作用部位、作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] World Health Organization. Fact sheets N° 369: depression [EB/OL]. (2015-10-01) [2016-01-04]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/.html>.
- [2] Dedovic K, Duchesne A, Engert V, et al. Psychological, endocrine and neural responses to social evaluation in subclinical depression [J]. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 2014, 9(10): 1632-1644.
- [3] Quesseveur G, Gardier AM, Guiard BP. The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(11): 1277-1294.
- [4] Fornaro M, McCarthy MJ, DeBerardis D, et al. Adjunctive agomelatine therapy in the treatment of acute bipolar II depression: a preliminary open label study [J]. *Neuropsych Dis Treat*, 2013, 9: 243-251.
- [5] Xie JP, Ren ZB, Ma YC, et al. Comparing study on therapeutic of

outpatients with agitated or anxiety depression by combination of SSRI and sodium valproate RX [J]. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2013, 18(1): 86-89.

- [6] Unterecker S, Reif A, Hempel S, et al. Interaction of valproic acid and the antidepressant drugs doxepin and venlafaxine: analysis of therapeutic drug monitoring data under naturalistic conditions [J]. *Int Clin Psychopharma*, 2014, 29(4): 206-211.
- [7] Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, et al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2011, 32(1): 7-24.
- [8] Hu XY, Li N, Fei HZ, et al. Anti-depressive effect of reboxetine on non-transporter inhibition in rats [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2012, 34(19): 1977-1980.
- [9] Fei HZ, Wang H, Hu XY, et al. Improvement of oxidative stress and HPA axis function and elevation of BDNF expression involved in anti-depressive effect of paroxetine in rat model [J]. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2012, 17(10): 1137-1142.
- [10] Tang M, Lei JY, Sun X, et al. Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression [J]. *Brain Res*, 2013, 1513: 127-134.
- [11] Chen P, Fan Y, Li Y, et al. Chronic social defeat up-regulates expression of norepinephrine transporter in rat brains [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(1): 9-20.
- [12] Li N, Wang H, Wen W, et al. Improvement of oxidative/anti-oxidative stress balance and expression of NET and 5-HTT involved in the anti-depressive effect of reboxetine [J]. *Clin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, 27(9): 593-597.
- [13] Hu XY, Fei HZ, Jiang XH, et al. Improving oxidative stress response and reversing abnormal expression of hippocampus NET and 5-HTT involved in anti-depressive effect of venlafaxine [J]. *Clin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2014, 30(6): 848-852.
- [14] Wang LJ, Qiu HM, Jiang XH, et al. Down-regulation of monoamine neurotransmitter synthetase expression involved in CUS-induced depression of rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2015, 31(4): 527-531.
- [15] Qin LJ, Liu D, Jiang XH, et al. Down-regulation of hippocampal TH and TPH expression involved in CUMS induced depressive behaviors of rats and interfering effects of venlafaxine [J]. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2014, 19(4): 398-403.