

氟西汀对 DISC1 转基因小鼠应激后抑郁和焦虑样行为的影响

陈静 李晗 张晨 洪武 崔东红

【摘要】 目的 探讨氟西汀对双重应激诱导的精神分裂症断裂基因 1(DISC1) 转基因小鼠抑郁和焦虑样行为的影响。方法 C57BL/6 野生型新生小鼠及 C57BL/6 LBD-DISC1 转基因新生小鼠各 16 只, 分别随机分为野生应激组、野生对照组和 DISC1 应激组、DISC1 对照组, 每组 8 只。应激组小鼠进行母婴分离和慢性不可预知轻度应激后, 4 组小鼠使用氟西汀治疗 4 周, 采用糖水消耗实验、强迫游泳实验及旷场实验测定小鼠行为。结果 氟西汀治疗后各组小鼠旷场实验中心区域移动距离和强迫游泳静止时间之间的差异无统计学意义, DISC1 应激组的糖水偏好度和体重仍偏低($P < 0.01$)。结论 氟西汀可改善双重应激诱导的 DISC1 转基因小鼠的抑郁和焦虑情绪, 但不能缓解其快感缺乏和体重降低。

【关键词】 氟西汀; 应激; DISC1 基因; 抑郁; 焦虑

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.10.001

Effects of fluoxetine on stress induced depressive-like and anxiety-like behaviors in DISC1 mice

CHEN Jing, LI Han, ZHANG Chen, et al. Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of fluoxetine on dual stress induced depressive-like and anxiety-like behaviors in Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) transgenic mice. **Methods** Sixteen C57BL/6 wild-type mice were randomly assigned into two groups with 8 in each group, the WT-stress group and the WT-control group. Sixteen C57BL/6 LBD-DISC1 transgenic mice were also randomly assigned into two groups with 8 in each, the DISC1-stress group and the DISC1-control group. The WT-stress group and the DISC1-stress group received maternal separation and chronic unpredictable mild stress. All mice were treated with fluoxetine for four weeks. The sucrose consumption, the forced swim test and the open field test were used to evaluate the depressive-like and anxiety-like behaviors. **Results** There was no significant difference in the immobility time in the forced swim test and the migration distance in the centre area in the open field test among each group of mice after the fluoxetine treatment. The preference for sucrose solution in DISC1-stress group and body weight were still low ($P < 0.01$). **Conclusions** Fluoxetine can improve the stress induced anxiety and depression in DISC1 mice. However, it cannot alleviate anhedonia and the loss of body weight.

【Key words】 Fluoxetine; Stress; Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1); Depression; Anxiety

抑郁障碍是一种严重的精神疾病, 终生发病率 15%, 到 2030 年抑郁症将成为全球最大的疾病负担^[1]。抑郁障碍的发病机制至今不明, 目前认为遗传、环境的交互作用导致抑郁的发生。前期我们以精神分裂症断裂基因 1(Disrupted in Schizophrenia 1, DISC1) 转基因为遗传因素, 采用母婴分离复合慢性不可预知轻度应激的双重应激为环境因素, 初步制

备了双重应激诱导的 DISC1 转基因小鼠抑郁模型, 发现应激和 DISC1 缺陷共同作用可导致小鼠出现抑郁样行为^[2], 但此模型对抗抑郁药物的反应尚不清楚。选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI) 是目前临床治疗抑郁障碍的一线药物, 其中氟西汀已被证明有效且不良反应较少^[3]。本研究使用氟西汀作为治疗药物, 研究抗抑郁药物对双重应激诱导的转基因小鼠抑郁和焦虑样行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用雄性 C57BL/6 野生型新生小鼠及 C57BL/6 DISC1 配体结合区域转基因(C57BL/6

基金项目: 上海市科技发展基金实验动物研究项目(12140904200); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81701344)

作者单位: 200030 上海交通大学医学院附属精神卫生中心(陈静、李晗、张晨、洪武、崔东红); 上海市重性精神病重点实验室 上海交通大学精神疾病转化医学研究重点实验室(李晗、崔东红)

通讯作者: 崔东红 Email:manyucc@126.com

LBD-DISC1 转基因) 新生小鼠各 16 只, 分别采用随机数字表的分组方法分为野生对照组、野生应激组、DISC1 对照组、DISC1 应激组, 每组 8 只。C57BL/6 野生型小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。C57BL/6 LBD-DISC1 转基因小鼠由国内合作者李卫东实验室赠送。该转基因小鼠为国际同行认可的基因工程小鼠模型之一, 其转基因系统可诱导。在没有诱导剂(Tamxifen, 他莫昔芬)时, DISC1 转基因融合蛋白虽可表达, 但被热休克蛋白包裹, 而进入蛋白降解过程。本研究在小鼠出生后第 7 天注射诱导剂他莫昔芬, 短片 DISC1 转基因融合蛋白被解放, 从而与野生型 DISC1 竞争目的蛋白的结合位点, 破坏 DISC1 正常功能^[4]。本实验方案获得上海市精神卫生中心伦理委员会批准。

1.1.2 试剂和仪器 他莫昔芬(Sigma, 美国), 葡萄糖(Sigma, 美国), 氟西汀(礼来, 美国), 天平仪(上海赞德仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型构建及氟西汀干预方法 小鼠置于室温(22±3)°C(热、冷应激除外)、相对湿度 55%~60%、12 h 光/暗(灯亮时间为 5: 00 至 17: 00, 通宵照明应激除外)环境中, 允许自由进食、水(禁食禁水应激除外)。两组转基因小鼠在出生后第 7 天注射他莫昔芬。出生后 7~12 d, 对野生应激组及 DISC1 应激组进行为期 6 d, 每天 3 h 的母婴分离。每天固定时间进行母婴分离, 每只幼鼠单独放置, 放置箱底部给予摄 37°C 持续保温。小鼠出生后 70~90 d 期间, 对野生应激组及 DISC1 应激组进行为期 21 d 的慢性不可预知轻度应激刺激^[2], 包括通宵照明(实验室光源连续 24 h 开启)、倾斜鼠笼(持续 16 h 将鼠笼倾斜 45°)、夹尾(持续 1 min)、摇晃(将小鼠放在 240 r/min 的摇床上 5 min)、禁食禁水(持续 24 h)、冰水游泳(将小鼠放置在 4°C 冰水中游泳 5 min)、潮湿垫料(垫料中倾倒入 150 ml 水, 16 h 后换垫料)。以上 7 种措施在 21 d 内随机采用, 使小鼠无法预测。在小鼠出生后 96~114 d, 给予每只小鼠腹腔注射 10 mg/kg 氟西汀, 连续 4 周。用生理盐水将氟西汀配成所需浓度的溶液, 新鲜配制。

1.2.2 糖水消耗实验 分别在慢性不可预知轻度应激程序结束后(小鼠出生后 91 d)及氟西汀治疗结束后(小鼠出生后 115 d)进行糖水消耗实验^[2]。计算糖水偏好度: 糖水偏好度 = 糖水消耗量 / 总液体消耗量 × 100%。糖水偏好度被看作是对奖励的反应, 对应抑郁障碍的快感缺乏症状。

1.2.3 旷场实验 分别在小鼠出生后 93 d 及小鼠出生后 117 d 进行旷场实验。用旷场跑动行为红外线检测系统测定小鼠移动距离。将小鼠置于长方形实

验盒内, 记录小鼠在中心区域的移动距离, 连续记录 5 min。每只小鼠实验完后用 75% 的酒精棉球擦拭实验地面, 消除前一只小鼠的气味对后面小鼠的影响。中心区域的移动距离反映小鼠的焦虑情绪。

1.2.4 强迫游泳 分别在小鼠出生后 94 d 及小鼠出生后 118 d 进行强迫游泳实验^[2]。记录放入水中 5 min 内的累计不动状态时间为静止时间。强迫游泳中静止时间反映小鼠的抑郁情绪。

1.2.5 测体重 分别在小鼠出生后 91 d 及小鼠出生后 115 d 测量每只小鼠的体重并计算治疗前后的体重改变。抑郁症患者常因食欲下降等因素导致体重下降。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。各组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较使用单因素方差分析(ANOVA), 每组治疗前后比较使用配对 *t* 检验。检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠糖水偏好度比较 见表 1。治疗前各组小鼠糖水偏好度的差异有统计学意义($P < 0.01$), 两两比较发现, 野生对照组小鼠的糖水偏好度高于其余 3 组($P < 0.01$), DISC1 应激组小鼠的糖水偏好度低于野生应激组和 DISC1 对照组($P < 0.01$)。经氟西汀治疗后, 野生应激组、DISC1 对照组及 DISC1 应激组的糖水偏好度均较前改善($P < 0.01$)。治疗后各组小鼠糖水偏好度的差异有统计学意义($P < 0.01$), 两两比较发现, 野生应激组、DISC1 对照组及 DISC1 应激组的糖水偏好度均低于野生对照组($P < 0.01$); 且 DISC1 应激组的糖水偏好度低于野生应激组和 DISC1 对照组($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠治疗前后糖水偏好度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
野生对照组	8	0.78 ± 0.09	0.86 ± 0.06	-1.89	0.10
野生应激组	8	0.47 ± 0.13*	0.69 ± 0.06*	-4.43	< 0.01
DISC1 对照组	8	0.55 ± 0.04*	0.77 ± 0.03*	-14.11	< 0.01
DISC1 应激组	8	0.13 ± 0.07**	0.64 ± 0.04**	-28.49	< 0.01
<i>F</i> 值		95.60	30.01		
<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01		

注: 与野生对照组比较 * $P < 0.01$, 与野生应激组和 DISC1 对照组比较 & $P < 0.05$

2.2 各组小鼠旷场实验中心区域的移动距离比较 见表 2。治疗前各组小鼠旷场实验的中心区域移动距离的差异有统计学意义($P < 0.01$), 两两比较发现, 野生应激组和 DISC1 应激组的中心区域移动距离低于野生对照组($P < 0.05, P < 0.01$), 且 DISC1 应激组的中心区域移动距离低于野生应激组($P < 0.01$)。经氟西汀治疗后, 野生应激组和 DISC1

应激组的中心区域移动距离较前增加, 各组小鼠的中心区域移动距离的差异无统计学意义。

表 2 各组小鼠治疗前后中心区域移动距离比较(cm, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后	t 值	P 值
野生对照组	8	2 423.57 ± 419.06	2 409.61 ± 349.69	0.42	0.69
野生应激组	8	1 965.13 ± 62.99 [*]	2 390.76 ± 219.28	-7.19	<0.01
DISC1 对照组	8	2 675.10 ± 603.15	2 598.92 ± 405.17	0.94	0.38
DISC1 应激组	8	1 355.10 ± 366.79 ^{*k}	2 373.62 ± 387.87	-22.75	<0.01
F 值		15.87	0.73		
P 值		<0.01	>0.05		

注: 与野生对照组比较 * $P < 0.05$, 与野生应激组比较 & $P < 0.01$

2.3 各组小鼠强迫游泳中静止时间的比较 见表 3。治疗前各组小鼠强迫游泳实验中静止时间的差异有统计学意义($P < 0.01$), 两两比较发现, 与野生对照组比较, 野生应激组和 DISC1 应激组小鼠的静止时间较长($P < 0.01$), DISC1 对照组小鼠的静止时间较短($P < 0.05$)。DISC1 应激组小鼠的静止时间长于 DISC1 对照组($P < 0.01$), 但是与野生应激组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。经氟西汀治疗后, 野生应激组、DISC1 对照组及 DISC1 应激组的静止时间均较前缩短, 各组小鼠的强迫游泳静止时间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠治疗前后强迫游泳静止时间的比较(s, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后	t 值	P 值
野生对照组	8	141.20 ± 8.47	140.75 ± 6.27	0.15	0.88
野生应激组	8	167.80 ± 5.72 [*]	143.75 ± 4.37	8.11	<0.01
DISC1 对照组	8	130.50 ± 3.87 [*]	139.75 ± 4.40	-3.78	<0.01
DISC1 应激组	8	172.40 ± 2.19 ^{*k}	144.25 ± 4.17	16.59	<0.01
F 值		107.06	1.65		
P 值		<0.01	>0.05		

注: 与野生对照组比较 * $P < 0.05$, 与 DISC1 对照组比较 & $P < 0.01$

2.4 各组小鼠体重的比较 见表 4。治疗前各组小鼠体重的差异有统计学意义($P < 0.01$), 两两比较发现, 野生对照组小鼠的体重高于其余 3 组($P < 0.01$), DISC1 应激组小鼠的体重低于其余 3 组($P < 0.01$)。经氟西汀治疗后, 各组小鼠体重的差异仍有统计学意义($P < 0.01$), 两两比较发现, 野生对照组小鼠的体重仍高于其余 3 组($P < 0.01$), DISC1 应激组小鼠的体重仍低于其余 3 组($P < 0.01$)。对小鼠治疗前后的体重改变进行两两比较发现, 野生应激组和 DISC1 应激组的体重增加高于野生对照组($P < 0.01$), 且野生应激组的体重增加高于 DISC1 应激组($P < 0.05$)。

3 讨论

强迫游泳实验易于操作、时间短, 是常用的评价抑郁动物模型的行为学实验^[5], 特别是在筛查抗抑郁药物方面具有良好的预测效度^[6], 并可用于评

表 4 各组小鼠治疗前后体重比较(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	治疗后	体重改变
野生对照组	8	26.72 ± 1.13	28.69 ± 0.43	1.96 ± 1.23
野生应激组	8	22.14 ± 0.84 ^{*k}	26.76 ± 0.70 ^{*k}	4.63 ± 0.37 ^{*k}
DISC1 对照组	8	23.95 ± 0.31 ^{*k}	26.29 ± 0.54 ^{*k}	2.34 ± 0.72
DISC1 应激组	8	20.44 ± 0.52 [*]	24.18 ± 0.49 [*]	3.74 ± 0.82 [*]
F 值		97.88	90.60	17.21
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: 与野生对照组比较 * $P < 0.01$, 与 DISC1 应激组比较 & $P < 0.05$

价转基因动物的抑郁样行为^[7]。通常认为强迫游泳的静止时间反映了抑郁情绪, 且能被许多抗抑郁药物改善^[8]。旷场实验是评价动物焦虑状态常用的行为学实验, 小鼠在中心区域的活动反映其焦虑情绪。本研究发现, 经过为期 4 周的氟西汀治疗后, 4 组小鼠强迫游泳中静止时间及旷场实验中心区域移动距离的差异均无统计学意义, 说明氟西汀可改善双重应激诱导的 DISC1 小鼠的抑郁和焦虑情绪。这与既往的类似研究结果一致。如 Dogra 等^[9] 及 Hennessy 等^[10] 均发现氟西汀可降低慢性不可预知应激导致的强迫游泳实验中静止时间延长。Farhan 和 Haleem^[11] 的研究显示氟西汀可减轻慢性不可预知应激后大鼠在旷场实验中出现的焦虑样行为。

糖水偏好反映了抑郁障碍中的快感缺乏症状。快感缺失近年来被看作为抑郁障碍的内表型^[12], 代表了抑郁障碍引起的奖赏过程障碍。奖赏过程是由应激引起的, 包括兴趣/欲望(希望得到奖励)、预期(奖励准备状态)、动机(获得奖励的初始能量支出)、努力(获得奖励的持续能量支出)、享乐反应(如奖励的享受)和反馈整合等一系列过程。对奖赏的欲望、对奖赏的期待、为得到奖赏的努力、对奖赏的享受、对应激-奖赏联系的学习认知特征等任何方面受损都会导致快感缺乏^[13]。测定快感缺乏症状可以使用食物、性等初级奖赏或摄影、钱等次级奖赏。对动物模型的研究主要使用前者, 而临床研究主要使用后者。糖水属于食物奖赏, 测定动物对本能性快感刺激的反应。Hamani 等^[14] 的研究显示抗抑郁药物通常可以升高慢性应激导致的糖水偏好下降。Dogra 等^[9] 也发现氟西汀可改善慢性不可预知应激导致的糖水偏好障碍。但本研究发现, 治疗后 DISC1 转基因小鼠的糖水偏好度及体重虽较前有所改善, 但仍偏低, 说明 4 周的氟西汀治疗未能完全缓解模型小鼠的快感缺乏和低体重。这可能与以下原因有关。首先, 既往的研究仅针对单一的慢性应激诱导的糖水偏好下降, 而本研究采用了早年母婴分离和慢性不可预知轻度应激的双重应激造模。母婴分离是一种与依恋相关的应激, 是最严重的早年

应激因素之一^[15]。临床研究已发现,有童年期创伤的抑郁障碍患者症状更严重,且抗抑郁药物的疗效更差^[16]。因此,早年应激和成年后慢性应激的双重作用可能加重了转基因小鼠的抑郁症状,使氟西汀的疗效下降。其次,临床研究发现快感缺乏和低体重是治疗中较晚得到改善的症状,且SSRI等抗抑郁药物治疗和心理治疗对快感缺乏的疗效均较低^[17]。如Boyer等^[18]使用另一种SSRI类药物舍曲林治疗抑郁障碍患者,发现21~56 d后快感缺失症状才得到改善,是最晚起效的症状。王玉婷等^[19]使用艾司西酞普兰治疗应激导致的大鼠抑郁样行为,发现对强迫游泳实验中行为绝望的治愈率达到了70%以上,远高于对糖水偏好实验中快感缺乏的30%治愈率。本研究中4周氟西汀治疗改善了强迫游泳实验中的静止时间延长,却没有使糖水偏好下降恢复正常,即对快感缺乏的治疗效果差于对行为绝望的治疗效果,提示4周的治疗时间可能对于治疗快感缺乏来说是不够的,这与以上研究结果相一致。最后,与奖赏有关的最重要的神经递质是多巴胺,阿片类物质和 γ -氨基丁酸(GABA)在体验奖赏的愉悦方面也起到重要作用^[20]。而本研究采用的抗抑郁药物氟西汀主要作用于5-HT系统,对多巴胺能、阿片类及GABA受体几乎没有影响,这也可能导致对快感缺乏的治疗效果较差。在以后的研究中,可以延长氟西汀治疗时间,或使用对多巴胺作用有增强效果的安非他酮等药物治疗,以进一步评价抗抑郁药物对双重应激诱导的DISC1转基因小鼠快感缺乏的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] 李强,陈敏,杨泰,等.抑郁症发病机制的研究进展[J].神经疾病与精神卫生,2016,16(5):524-527.
- [2] 陈静,李晗,张晨,等.环境对转基因小鼠抑郁样行为的影响[J].中国神经精神疾病杂志,2014,40(9):547-551.
- [3] Rayen I, van den Hove DL, Prickaerts J, et al. Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24 003.
- [4] Li W, Zhou Y, Jentsch JD, et al. Specific developmental disruption of disrupted-in-schizophrenia-1 function results in schizophrenia-related phenotypes in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(46): 18 280-18 285.
- [5] Doron R, Lotan D, Einat N, et al. A novel herbal treatment reduces depressive-like behaviors and increases BDNF levels in the brain of stressed mice [J]. Life Sci, 2014, 94(2): 151-157.
- [6] Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior[J]. J Vis Exp, 2015(97).
- [7] Park SK, Nguyen MD, Fischer A, et al. Par-4 links dopamine signaling and depression[J]. Cell, 2005, 122(2): 275-287.
- [8] Czéh B, Fuchs E, Wiborg O, et al. Animal models of major depression and their clinical implications[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016, 64: 293-310.
- [9] Dogra S, Kumar A, Umrao D, et al. Chronic Kappa opioid receptor activation modulates NR2B: Implication in treatment resistant depression[J]. Sci Rep, 2016, 6: 33 401.
- [10] Hennessy MB, Schreiber AD, Schiml PA, et al. Maternal separation increases later immobility during forced swim in guinea pig pups: evidence for sensitization of a depressive-like state[J]. Dev Psychobiol, 2017, 59(1): 128-132.
- [11] Farhan M, Haleem DJ. Anxiolytic profile of fluoxetine as monitored following repeated administration in animal rat model of chronic mild stress [J]. Saudi Pharm J, 2016, 24(5): 571-578.
- [12] Pizzagalli DA. Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model[J]. Annu Rev Clin Psychol, 2014, 10: 393-423.
- [13] Rizvi SJ, Pizzagalli DA, Sproule BA, et al. Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 65: 21-35.
- [14] Hamani C, Machado DC, Hipólido DC, et al. Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: role of serotonin and brain derived neurotrophic factor[J]. Biol Psychiatry, 2012, 71(1): 30-35.
- [15] Mandelli L, Petrelli C, Serretti A. The role of specific early trauma in adult depression: A meta-analysis of published literature. Childhood trauma and adult depression[J]. Eur Psychiatry, 2015, 30(6): 665-680.
- [16] 苑杰,王萌,郭鑫,等.氟西汀对卒中后抑郁的预防作用[J].中华行为医学与脑科学杂志,2016,25(10):953-957.
- [17] McMakin DL, Olinio TM, Porta G, et al. Anhedonia predicts poorer recovery among youth with selective serotonin reuptake inhibitor treatment-resistant depression[J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2012, 51(4): 404-411.
- [18] Boyer P, Tassin JP, Falissart B, et al. Sequential improvement of anxiety, depression and anhedonia with sertraline treatment in patients with major depression[J]. J Clin Pharm Ther, 2000, 25(5): 363-371.
- [19] 王玉婷,王雷,张逸,等.母爱剥夺对成年大鼠应激反应及艾司西酞普兰作用的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2017,26(3):198-203.
- [20] van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, et al. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption[J]. Neuron, 2012, 73(6): 1 184-1 194.

(收稿日期:2017-09-18)