论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0430-04

抗抑郁药物促进抑郁模型大鼠行为和海马血管内皮细胞生长因子的表达

黎雪梅,况 利 (重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨抗抑郁药物对抑郁模型大鼠海马血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)的作用及机制。**方法** 选择成年雄性SD大鼠40只,分为应激+氟西汀组(氟西汀组)、应激+噻奈普汀组(噻奈普汀组)、应激组(模型组)、应激+生理盐水组(盐水对照组)、空白对照组,每组8只。采用孤养与慢性不可预见性中等强度应激(chronic unpredieted mild suress, CUMS)联合建立抑郁模型,旷场分析和液体消耗实验进行行为学观察。对抑郁模型进行抗抑郁药物氟西汀和噻奈普汀以及生理盐水作为对照灌胃30d,免疫组化观察各组大鼠海马VEGF表达情况。**结果** 氟西汀组、噻奈普汀组与生理盐水对照组通过较旷场分析、液体消耗试验显示抑郁模型成功,免疫组化图像分析氟西汀组、噻奈普汀组与生理盐水对照组大鼠海马VEGF表达有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 抗抑郁药物氟西汀、噻奈普汀均能促进抑郁模型大鼠海马VEGF的表达,VEGF可能参与抑郁症的病理生理机制。

关键词: 抑郁症; 海马; 氟西汀; 噻奈普汀; 血管内皮细胞生长因子

中图法分类号: R-332; R749.4; R971.43 **文献标识码:** A

Effect of antidepressant on behavior and vascular endothelial cell growth factor in hippocampus of rat model of depression

LI Xue-mei, KUANG Li (Center of Mental Health, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the mechanism by which antidepressant works on vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in rat hippocampus of depression model. Methods Forty SD rats were randomly and equally divided into 5 groups: stress + fluoxetine, stress + tianeptine, stress, stress + normal sodium, blank matched control. We adopted separation and chronic unpredicted mild stress to establish depression in all rats except those in blank matched control group, and the behavior of all animals was evaluated by open-field and fluid consumption test. VEGF expression was detected by immunohistochemisty after intragastric administration respectively with fluoxetine, tianeptine or normal sodium for 30 d. Results VEGF expression in hippocampus was decreased in all stress groups compared with control group ($P<0.05$). After antidepressant administration for 30 d, VEGF expression in hippocampus was increased in fluoxetine group and tianeptine group compared with normal sodium group ($P<0.05$). Conclusion Chronic antidepressant treatment significantly increases VEGF expression in hippocampus of rat depression model, suggesting VEGF may be correlated with the pathophysiology of depression.

Key words: depression; hippocampus; fluoxetine; tianeptine; vascular endothelial cell growth factor

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)是一种血管源性多肽,能够维持正常血管形态,促进血管生成,可在很多正常成人和动物组织中表达,脑组织中VEGF具有保护神经元、促进神经干细胞增殖的作用[1]。目前研究表明神经元再生在成年哺乳动物海马(hippocampal formation)脑区的降低是导致抑郁症发生的重要因素,抗抑郁药物或电休克治疗后能改善抑郁症状,促进神经元再生[2],而VEGF表达对海马神经再生和存活起重要作用[3]。本研究就应激对大鼠海马VEGF表达的影响,以及抗抑郁药物对应激大鼠海马VEGF表达的作用进行探讨,为将来进一步研究抑郁症的病因及开发新的抗抑

基金项目: 重庆市科委资助项目(渝科发计字[2004]54号)
Supported by the Project of Scientific Committee of Chongqing([2004]54)

作者简介: 黎雪梅,女,重庆市人,硕士,医师,主要从事青少年心理卫生和精神疾病方面的研究。电话:(023)68801314

通信作者: 况 利,电话:(023)68801314,E-mail: kuangli0308@126.com

收稿日期: 2008-07-03; **修回日期:** 2008-10-06

郁药物提供基础资料。

1　材料与方法

1.1　材料

①实验动物:成年雄性 SD 大鼠 40 只,由第三军医大学实验动物中心提供,体质量(200 ± 20)g。经过对实验大鼠进行初选,保证被试的同一性。②药品:氟西汀(Fluoxetine),商品名百优解,美国礼来亚洲公司生产,20 mg/片。噻奈普汀(Tianeptine),商品名达体朗,法国施维雅药厂生产,2.5 mg/片。③试剂: VEGF 多克隆鼠抗来自 Santa Cruz 公司,S-P 试剂盒、DAB 显色剂来自北京中杉公司。

1.2　实验方法

1.2.1　动物分组及模型建立　　大鼠购置后先熟悉饲养环境 1 周,每天人工触摸 2 min。1 周后随机分为应激 + 氟西汀组(氟西汀组)、应激 + 噻奈普汀组(噻奈普汀组)、应激组(模型组)、应激 + 生理盐水组(盐水对照组)、空白对照组。每组 8 只。行旷场分析、液体消耗试验,结束后对照组即取标本,余 32 只单笼饲养,行 21 d 慢性不可预见性中等强度应激(CUMS)处理[4]。具体应激为:禁食 48 h,禁饮 24 h,冰水游泳(4 ℃、5 min),热水游泳(45 ℃、5 min),电击足底(电流 1 mA、电压 45 V,每隔 1 min 刺激 1 次,每次刺激 10 s,共 30 min),夹尾 1 min,摇晃(每秒 1 次、持续 15 min)。实验过程中每种刺激至少给予 2 次,每天随机给予 1 种刺激,除禁食禁饮外每次应激实验均在远离饲养间的另一实验室进行。第 22 天行旷场分析、液体消耗试验,试验后应激组即取标本,氟西汀组行氟西汀(1.8 mg · kg^{-1} · d^{-1})灌胃,噻奈普汀组行噻奈普汀(3.375 mg · kg^{-1} · d^{-1})灌胃,盐水对照组行 2 ml 生理盐水灌胃,持续灌胃 30 d,30 d 后行旷场分析和液体消耗试验,结束后均取标本。

1.2.2　旷场分析(open-field test)及液体消耗试验(fluid consumption test)　　旷场分析箱(80 cm × 80 cm × 40 cm)周壁为黑色,底面为面积相等的 25 块方格,将大鼠放入中央格,观察 3 min 活动情况。主要观察指标为中央停格时间、穿越格子数、站立次数、粪便粒数。另大鼠购置后熟悉环境期间,训练动物适应含糖饮水,每笼同时放置 2 个水瓶,第 1 天,两瓶均为 1% 蔗糖水,随后几天每笼大鼠一瓶 1% 蔗糖水,一瓶纯水。在应激实验前 1 d,应激第 22 天,灌胃 30 d 后进行动物的基础糖水、纯水消耗实验。计算动物的总液体消耗、糖水消耗、纯水消耗,最后计算大鼠的糖水偏爱(糖水偏爱 = 糖水消耗/总液体消耗 × 100%)[2]。

1.2.3　海马 VEGF 表达　　采用免疫组织化学方法。麻醉动物,经左心室-主动脉插管,先用 100 ml 生理盐水快速灌注冲洗,随后用 400 ml 4% 多聚甲醛 PBS 液,先快后慢,共需 40 ~ 60 min。小心开颅取脑并修块,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋、冠状切片、片厚约 10 μm。切片脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭过氧化物酶,按照 S-P 试剂盒上实验方法进行,(VEGF 浓度 1∶200),DAB 显色,苏木精复染,二甲苯透明,中性树胶封片。所有阴性照片不着色或者呈淡背景色。采用北航医学图像分析管理系例-真彩色病理图像分析系统(4.0),对免疫组化结果进行分析。指标包括平均灰度、平均光密度及面密度,灰度和光密度显示染色强度,面密度显示海马 VEGF 再生的情况。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,检验标准采用 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　旷场分析结果

噻奈普汀组及氟西汀组在应激后中央停格时间、穿越格子数、站立次数及粪便粒数均与应激前差异有统计学意义($P < 0.01$),提示大鼠应激后表现出明显的抑郁状态,活动能力下降、兴趣丧失。经灌胃 4 周后氟西汀组及噻奈普汀组在中央停格时间、穿越格子数、站立次数与生理盐水组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$),氟西汀组与噻奈普汀组各指标比较无统计学意义(表 1)。液体消耗实验结果表明,应激后各指标均较应激前有统计学意义($P < 0.01$),应激后表现出明显的快感缺乏。氟西汀组在糖水消耗、纯水消耗及糖水偏爱方面与盐水对照组有统计学意义($P < 0.05$),而噻奈普汀组与盐水对照组在液体消耗实验的 3 个方面的比较均无统计学意义($P > 0.05$)。氟西汀组与噻奈普汀组液体消耗实验结果也无统计学差异($P > 0.05$)(表 1)。

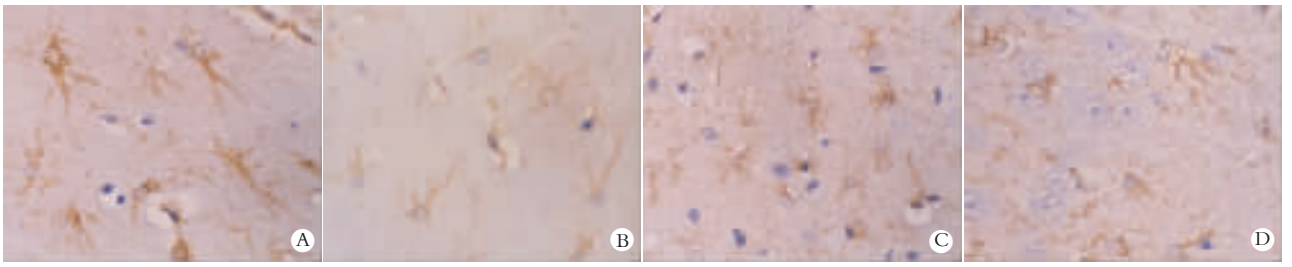
2.2　各组海马 VEGF 表达的比较

免疫组化图像分析结果显示应激组海马 VEGF 表达的平均灰度值、平均光密度及面密度与空白对照组比较有统计学意义(t 值分别为 2.15,2.53,2.27,$P < 0.05$)。氟西汀组与盐水对照组比较平均灰度、平均光密度及面密度有统计学意义(t 值分别为 34.08,2.53,2.189,$P < 0.05$),噻奈普汀组与应激盐水对照组比较平均灰度、平均光密度、面密度有统计学意义(t 值分别为 3.90,2.53,2.39 ,$P < 0.05$)。氟西汀组与噻奈普汀组图像分析结果无统计学意义。(见图 1 及表 2)。

表 1　旷场分析及液体消耗实验结果

组别	n	中央停格时间	穿越格子数	站立次数	粪便粒数	糖水消耗(ml/24 h)	纯水消耗(ml/24 h)	糖水偏爱(%)
给予了应激处理的 4 组								
应激前	32	2.5 ± 0.7	45.1 ± 10.2	27.4 ± 5.5	4.3 ± 1.9	13.5 ± 3.8	3.1 ± 1.2	82.5 ± 6.8
应激后	32	6.1 ± 2.5[a]	26.3 ± 8.6[a]	12.5 ± 3.9[a]	7.1 ± 2.5[a]	7.6 ± 3.2[a]	6.9 ± 2.2[a]	56.7 ± 13.4[a]
盐水对照组	8	5.6 ± 1.7	28.1 ± 8.8	12.9 ± 3.8	6.4 ± 2.5	9.8 ± 2.9	5.2 ± 1.4	65.3 ± 9.8
氟西汀组	8	4.2 ± 1.4[b]	36.8 ± 8.9[b]	18.4 ± 5.2[b]	4.9 ± 3.1	12.6 ± 2.1[c]	4.1 ± 0.8[b]	75.6 ± 7.9[b]
噻奈普汀组	8	4.0 ± 1.5[b]	37.6 ± 7.5[b]	19.4 ± 4.9[c]	5.1 ± 2.5	11.5 ± 2.4	4.8 ± 0.9	72.5 ± 9.4

a: $P < 0.01$,与应激前比较;b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$,与盐水对照组比较



A：正常对照组；B：应激组；C：FLU 组；D：TIA 组

图 1 大鼠海马组织 VEGF 表达 （S-P ×400）

表 2 海马组织 VEGF 免疫组化结果

组别	*n*	平均灰度值	平均光密度	面密度
对照组	8	185.8 ±13.5	0.12 ±0.02	0.0418 ±0.0039
应激组	8	201.0 ±14.7[b]	0.10 ±0.01[a]	0.0369 ±0.0047[a]
盐水对照组	8	175.1 ±10.5	0.14 ±0.01	0.0456 ±0.0065
氟西汀组	8	156.3 ±8.1[d]	0.16 ±0.02[c]	0.0523 ±0.0058[c]
噻奈普汀组	8	154.7 ±10.4[d]	0.16 ±0.02[c]	0.0545 ±0.0083[c]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与应激前比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与盐水对照组比较

3 讨论

本实验采用单笼饲养与 CUMS 建立抑郁模型，应激后大鼠呈明显的活动能力下降、兴趣丧失、快感缺乏，抑郁动物模型建立可靠。2 种抗抑郁药物治疗 30 d 后大鼠旷场分析实验较无干预的生理盐水对照组有显著差异，氟西汀组与盐水对照组糖水偏爱有统计学意义表明经氟西汀治疗后快感缺失明显缓减，且经氟西汀治疗后本实验中 2 种药物在旷场分析实验、液体消耗实验都无统计学意义，2 种药物疗效相当。

已有研究表明，VEGF 是血管形成和造血过程中的关键因子，其主要机制是通过与血管内皮细胞上的酪氨酸激酶受体相互作用，增强血管内皮细胞的增殖和生存，促进血管的形成[5]。最近研究显示，VEGF 除了在血管形成中具有关键作用外，其受体 VEGFR1（Fh1）and VEGFR2（KDR）在包括 NSCs、神经元、神经胶质细胞等非内皮细胞中广泛表达，并在胚胎脑发育和成年脑损伤后的组织再生过程中也发挥着重要的作用，其效应主要包括改善神经营养、加强神经保护和促进神经生长（包括成年脑皮质神经元的增殖、分化、神经突触的生长）[6-10]。VEGF 可在很多正常成人和动物组织中表达，但一般水平较低，在代谢旺盛、血供丰富的组织 VEGF 的表达高于其它组织。缺氧、缺血及实体肿瘤已被证实可以提高 VEGF 的表达，某些病理状态也可能有 VEGF 合成的增加[11,12]。本实验显示正常对照组 VEGF 有表达，经孤养与 CUMS 处理后，应激组 VEGF 表达较正常对照组显著减少。大鼠在受到应激后，理论上应激初期海马结构神经细胞的缺血缺氧状态能使 VEGF 表达增加，但我们实验结果显示在 21 d 应激后大鼠海马 VEGF 表达显著小于对照组，可能长期应激造成 VEGF 合成失代偿的状态。

氟西汀和噻奈普汀这 2 种药物在现行的神经递质理论方面具有相反的作用，氟西汀为选择性 5-HT 再摄取抑制剂，而噻奈普汀则增加突触间隙 5-HT 的重吸收。而临床研究表明这 2 种药物具有相当的疗效和安全性，这为单纯从递质水平来解释抑郁症的病理机制和治疗提供了矛盾的理论依据。这可能跟 2 种抗抑郁药物最终可能主要通过 G 蛋白影响细胞内信号转导，提高环磷酸腺苷（cAMP）浓度，导致 cAMP 信号级联及其下游靶标 cAMP 反应元件结合蛋白（CREB）等发生变化，激活蛋白激酶 A（PKA），进入细胞核后促转录因子磷酸化，诱导转录基因表达，使神经营养因子（NF）及其受体表达上调并延长表达，在受体水平和 G 蛋白水平这 2 个环节产生作用[13-15]，从而导致海马中神经发生增加。经抗抑郁药物治疗后 VEGF 表达较正常对照组和生理盐水组显著增加，VEGF 的主要生物学效应是促进内皮细胞的分裂，并可提高内皮通透性，与其促分裂作用相一致，在体内亦有强大的促血管新生作用，而 VEGF 的表达增多可能对抑郁模型大鼠神经发生及其症状改善具有重要作用。2 种抗抑郁药在递质水平作用不同，最终可能主要通过 G 蛋白影响细胞内信号转导，在受体水平和 G 蛋白水平这 2 个环节产生作用，提高环磷酸腺苷（cAMP）浓度，导致 cAMP 信号级联及其下游靶标 cAMP 反应元件结合蛋白（CREB）等发生变化，激活蛋白激酶 A（PKA）和蛋白激酶 C（PKC），进入细胞核后促转录因子磷酸化，诱导转录基因表达，使 VEGF 和神经营养因子及其受体表达上调并延长表达，从而导致海马中神经发生增加，发挥抗抑郁作用[15,16]。神经营养因子促进神经干细胞增殖迁移分化，VEGF 则为神经再生提供了良好的血运环境，两者缺一不可，协同作用。

抑郁症患者存在海马结构萎缩、神经元再生受抑

制、神经元凋亡增加,VEGF 可能具有很大的潜在的治疗价值。提高 VEGF 水平不仅可以促进血管新生,增加局部血液供应,为神经元修复提供物质保障,还可以直接促进神经干细胞增殖,增加神经元和胶质细胞数量。具体机制及其临床应用尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Jin K, Zhu Y, Sun Y, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(18):11946 – 11950.

[2] Malberg J E, Schechter L E. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs[J]. Curr Pharm Des,2005, 11(2): 145 – 155.

[3] Frodl T, Meisenzahl E M, Zetzsche T, *et al*. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression[J]. Am J Psychiatry, 2002,159(7):1112 – 1118.

[4] 许　晶,李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(1):14 – 17.

[5] Ema M, Faloon P, Zhang W J, *et al*. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse [J]. Genes Dev, 2003, 17(3):380 – 393.

[6] Palmer T D,Willhoite A R,Gage F H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis [J]. J Comp Neurol, 2000,425(4):479 – 494.

[7] Schwarz Q,Gu C,Fujisawa H,*et al*. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve[J]. Genes Dev,2004,18(22): 2822 – 2834.

[8] Sondell M, Lundborg G ,Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system[J]. J Neurosci, 1999, 19(14):5731 – 5740.

[9] Sun Y, Jin K, Childs J T, *et al*. Vascular endothelial growth factor – B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration[J]. Dev Biol, 2006, 289(2): 329 – 335.

[10] Le-Bras B, Barallobre M J, Homman-Ludiye J, *et al*. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain [J]. Nat Neurosci, 2006, 9 (3) :340 – 348.

[11] Marti H J, Bernaudin M, Bellail A, *et al*. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3):965 – 976.

[12] Shayit M, Yadid G, Overstreet D H, *et al*. 5-HT(1A) receptor subsensitivity in infancy and supersensitivity in adulthood in an animal model of depression[J]. Brain Res, 2003, 980(1):100 – 108.

[13] Gartside S E, Leitch M M, Young A H. Altered glucocorticoid rhythm attenuates the ability of a chronic SSRI to elevate forebrain 5-HT: implications for the treatment of depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2003,28(9):1572 – 1578.

[14] McEwen B S, Chattarji S. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2004,14 Suppl 5:S497 – S502.

[15] Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus[J]. J Neurosci, 2005, 25(5): 1089 – 1094.

[16] Khawaja X, Xu J, Liang J J, *et al*. Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies [J]. J Neurosci Res, 2004, 75(4):451 – 460.

(编辑　邓强庭)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$,卡方的符号是希腊字母 χ^2,自由度的符号是希腊文“υ”,不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“r”,不能误为希腊文“γ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等,不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如:^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角,例如:$^{99}Tc^{m}$、$^{133}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写,RNA 应大写。

本刊编辑部