论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0058-04

5-羟色胺转运体敲除小鼠在应激下焦虑行为和HPA轴的改变

蒋 雪[1],邓永兵[2],安 娜[1],吴利亚[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室[1];400014 重庆,重庆市急救医疗中心神经外科[2])

[摘要] **目的** 研究5-羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT)敲除小鼠焦虑行为及ACTH和皮质酮分泌变化。**方法** 将基因型为$SERT^{+/-}$的雌雄小鼠交配产子,并把鉴定后子代小鼠按基因型($SERT^{+/+}$、$SERT^{+/-}$、$SERT^{-/-}$)分为对照组和EPM组,每组15只。利用高架十字迷宫作为应激原刺激小鼠,观察各组小鼠的焦虑行为,并测定各组小鼠的ACTH和皮质酮分泌。**结果** ①基因型PCR成功鉴定$SERT^{+/+}$、$SERT^{+/-}$和$SERT^{-/-}$的小鼠。②$SERT^{+/-}$和$SERT^{-/-}$小鼠的开臂停留时间、开臂停留时间百分比、进入开臂的次数和进入开臂的次数百分比较$SERT^{+/+}$均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。③EPM刺激下,$SERT^{+/-}$和$SERT^{-/-}$小鼠ACTH分泌的增加显著高于$SERT^{+/+}$($P<0.05$),$SERT^{-/-}$小鼠皮质酮分泌的增加显著高于$SERT^{+/+}$($P<0.05$)。**结论** SERT敲除小鼠在应激条件下易产生焦虑,并且ACTH和皮质酮分泌显著升高。

[关键词] 5-羟色胺转运体;高架十字迷宫;ACTH;皮质酮;敲除小鼠
[中图法分类号] R749.720.2; R394-33; R363.25 [文献标志码] A

Change of anxious behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in serotonin transporter knockout mice under stress

Jiang Xue[1], Deng Yongbing[2], An Na[1], Wu Liya[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, Chongqing Emergency Center, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the change of anxious behavior and secretion of adrenocorticotropic hormore (ACTH) and corticosteron in serotonin transporter (SERT) knockout mice. **Methods** Heterozygous SERT mutant mice ($SERT^{+/-}$) were mated to produce offspring. Thirty offspring mice were divided into control group ($n=15$) and elevated plus maze (EPM) group ($n=15$) according their genotype ($SERT^{+/+}$, $SERT^{+/-}$, $SERT^{-/-}$). The mice were stimulated with EPM as a stressor and their anxious behaviors were observed. ACTH and corticosteron levels in the mice were measured. **Results** (1) The genotypes were identified in $SERT^{+/+}$, $SERT^{+/-}$, and $SERT^{-/-}$ mice respectively by PCR. (2) The open arm time (OT), the OT %, the open arm entry (OE) and OE% were significantly lower ($P<0.05$, $P<0.01$). (3) The ACTH level was significantly higher in $SERT^{+/-}$ and $SERT^{-/-}$ mice than in $SERT^{+/+}$ mice after EPM stimulation ($P<0.05$) while the corticosteron level was significantly higher in $SERT^{-/-}$ mice than in $SERT^{+/+}$ mice ($P<0.05$). **Conclusion** SERT knockout mice are easy to have anxiety with their ACTH and corticosteron level significantly increased under stress.

[**Key words**] serotonin transporter; elevated plus-maze; ACTH; corticosteron; knockowt mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001017) and the Foundation of Science and Technology Committee of Chongqing of Education (2010-5). Corresponding author: Jiang Xue, E-mail: jiangxue868@sina.com

5-羟色胺转运体连接的启动子区域(5-HT transporter linked promoter region,5-HTTLPR)的多态性现象是指在5-羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT)基因启动子区域存在的44个碱基对的插入或缺失突变,如长等位基因(l)的插入突变和短等位基因(s)的缺失突变。比较两种突变的SERT表达水平发现,携带l的个体表达SERT的效率高于s个体[1-2]。研究表明,5-HTTLPR多态性与焦虑相关的人格障碍有关,如神经质[3],而且与常用抗焦虑药物选择性5羟色胺再吸收抑制剂的疗效相关[4]。但是研究5-HTTLPR多态性导致对应激敏感性增加的细胞和分子机制在人类身上很难进行。SERT敲除小鼠,尤其是$SERT^{+/-}$小

[基金项目] 国家自然科学基金(81001017);重庆市教育委员会科技基金(教科文2010-5)
[通信作者] 蒋 雪,E-mail: jiangxue868@sina.com

鼠,与人类 s 携带者在许多方面都表现出相似性。本实验利用高架十字迷宫(elevated plus maze,EPM)实验,研究 SERT 敲除小鼠焦虑行为及促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropic hormones,ACTH)和皮质酮分泌变化,以期为研究 5-HTTLPR 多态性致应激敏感性增加发生的机制提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

基因型为 $SERT^{+/-}$ 小鼠购自 Taconic farm 公司,雌雄小鼠进行交配,产下子代小鼠的基因型通过基因型 PCR 进行鉴定。用于实验的小鼠为 2 ~ 5 月龄、体质量为 20 ~ 25 g。

1.2 仪器

高架十字迷宫:San Diego 公司;γ 计数仪 :Wizard 公司;闪烁计数仪:Beckman 公司;低温离心机:Beckman 公司。

1.3 试剂

^{125}I-ACTH:Amersham 公司;^{3}H-标记的皮质激素:Amersham 公司;ACTH 的抗血清:IgG 公司;羊抗兔的 γ-球蛋白:Calbiochem 公司,闪烁液:Fisher 公司;引物和 PCR 试剂盒:Invitrogen 公司。

1.4 方法

1.4.1 基因型 PCR 小鼠尾组织 DNA 1 μl,上游引物(5′-TCACGGCTGCAGTGATAAGT -3′)和下游引物(5′- TGCTGACTGGAGATCAGGC -3′)各 0.2 μl, 10 × *Taq* 酶缓冲液 1 μl, 2 mmol/L 的 dNTP 2 μl, *Taq* 酶 0.2 μl,50 nmol/L 的 $MgCl_2$ 0.3 μl,高压灭菌的去离子水 5.1 μl。循环参数为 95 ℃/5 min 预变性,94 ℃/30 s 激活 *Taq* 酶,56 ℃/30 s 退火,72 ℃/1 min 延伸,35 个循环, 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。野生型小鼠即 $SERT^{+/+}$ 只有 1 条 1.4 kb 的条带,$SERT^{-/-}$ 小鼠只有 1 条 2 kb 的条带,而 $SERT^{+/-}$ 的小鼠会在 1.4 kb 和 2 kb 各出现一条带。

1.4.2 EPM 实验 将小鼠按 3 个基因型($SERT^{+/+}$、$SERT^{+/-}$、$SERT^{-/-}$)分为对照组和 EPM 组,每组 15 只。EPM 组按照 Holmes 等[5-6]进行 EPM:小鼠被放置在十字高架的中心区域,面对开放的手臂,自由活动,计算机将自动记录下述指标:①进入开臂的次数(open arm entry,OE);②进入开臂次数百分比(the percentage of OE,OE%);③在开臂停留时间(open arm time,OT);④开臂停留时间百分比(the percentage of OT,OT%)。每只小鼠迷宫时间为 5 min,结束后用酒精擦拭迷宫,清除粪便,继用干布擦净后再进行下一只小鼠的测试。

1.4.3 血浆内 ACTH 和皮质酮测定[7-8] (1)样品制备:EPM 后立即处死小鼠,收集颈部大血管的血液;对照组小鼠在拿出笼子后立即被处死,收集血液。将收集的血液在 4 ℃、5 000 r/min 离心 20 min,提取上清液,储存在 -80 ℃冰箱备用。(2)ACTH 测定:将 20 μl 样品血浆或者一定梯度的标准 ACTH (1 - 39)(0.1 ~ 20 pg)加入分析缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.6, 含 1% BSA, 0.025 mol/L EDTA,0.5% 兔血清,25 KIU/ml 抑酶肽) 按 1∶30 000 稀释的 100 μl 抗血清,混匀,4 ℃孵育 24 h;再在溶液中加入 100 μl 的 ^{125}I- ACTH (2 000 cpm/0.1 ml),混匀,4 ℃孵育 24 h;再在溶液中加入 100 μl 的分析缓冲液按 1∶50 稀释的二抗,羊抗兔 γ-球蛋白,混匀,4 ℃ 孵育 24 h;加入 1.5 ml 的冰 PBS 缓冲液,混匀,15 000 × *g*、4 ℃离心 40 min;小心倾去上清液;用 γ 计数仪检测沉淀的放射活性。(3)皮质酮测定:将 3 μl 样品血浆或者一定梯度的标准皮质激素(0.01 ~ 5 ng)和 0.5 ml 分析缓冲液(0.1 mol/L PBS, 0.1% gelatin, 0.1% sodium azide)混合均匀,放于 80 ℃水浴中孵育 20 min;冷却至室温,加入 100 μl 皮质激素抗血清和 100 μl 的[^{3}H]标记的皮质激素(700 cpm),混匀,4 ℃孵育过夜;加入 0.2 ml 的活性炭悬浮液(62.5 mg Dextran-T70 and 625 mg Norit A in100 ml assay buffer),充分混匀,4 ℃放置 20 min,再 4 ℃、15 000 × *g* 离心 20 min;将上清液倒入闪烁管,加入 5 ml 闪烁液,用 Beckman 闪烁计数仪的 ^{14}C channel 测定放射活性。

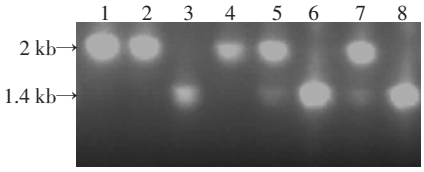
1.5 统计学分析

采用 Abacus Concepts 公司的 StatView 5.0 统计分析软件进行。组间比较用单因素方差分析和 student Neuman-kauls post-hoc 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 SERT 敲除小鼠基因型的鉴定

如图 1 所示,野生型小鼠只有 1 条 1.4 kb 的条带,故编号 3、6、8 为 $SERT^{+/+}$ 小鼠;$SERT^{-/-}$ 小鼠只有 1 条 2 kb 的条带,故编号 1、2、4 为 $SERT^{-/-}$ 小鼠;$SERT^{+/-}$ 小鼠在 1.4 kb 和 2 kb 各出现一条带,故编号 5、7 为 $SERT^{+/-}$ 小鼠。



1 ~ 8:小鼠编号

图 1 小鼠基因型鉴定的 PCR 琼脂糖电泳结果

2.2 SERT 敲除小鼠的 EPM 行为改变

如表 1 所示,与 $SERT^{+/+}$ 小鼠相比,$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的 OT、OT%、OE 和 OE% 均显著性降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠相比,各指标差异均不显著($P > 0.05$)。

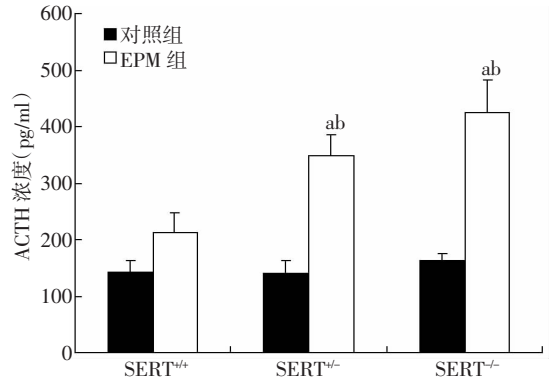
表 1 EPM 对 SERT 敲除小鼠行为的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

基因型	OT	OT%	OE	OE%
$SERT^{+/+}$	93.52 ± 5.26	35.35 ± 3.64	30.2 ± 10.6^{b}	34.39 ± 1.49
$SERT^{+/-}$	41.26 ± 7.57^{b}	12.22 ± 4.44^{b}	12.8 ± 3.5	15.95 ± 3.17^{b}
$SERT^{-/-}$	36.42 ± 90.5^{b}	11.15 ± 1.92^{b}	6.4 ± 1.5^{a}	11.79 ± 2.49^{b}

a:$P < 0.05$, b:$P < 0.01$,与 $SERT^{+/+}$ 比较

2.3 EPM 对 SERT 敲除小鼠 ACTH 分泌的改变

如图 2 所示,在基础条件下,3 种基因型小鼠 ACTH 分泌没有显著差异($P > 0.05$)。5 min EPM 后,3 种基因型小鼠 ACTH 分泌均出现增加,$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的增加差异显著($P < 0.05$)。同时这种升高方式与基因型有关,$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠 EPM 刺激下 ACTH 的分泌增加显著高于 $SERT^{+/+}$ EPM 组($P < 0.05$)。

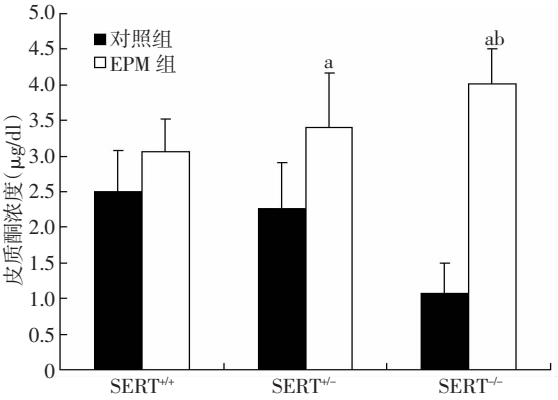


a:$P<0.05$,与对照组同一基因型比较; b:$P<0.01$,与相同处理组 $SERT^{+/+}$ 比较

图2 SERT 敲除小鼠血浆中 ACTH 浓度测定

2.4 EPM 对 SERT 敲除小鼠皮质酮分泌的改变

如图3所示,基础条件下 $SERT^{-/-}$ 小鼠的皮质酮分泌显著低于 $SERT^{+/+}$ 小鼠($P<0.05$),5 min 的 EPM 刺激能使3种基因型小鼠皮质酮分泌均出现增加,$SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的增加差异显著($P<0.05$)。同时这种升高方式也与基因型有关,$SERT^{-/-}$ 小鼠 EPM 刺激下皮质酮分泌增加显著高于 $SERT^{+/+}$ EPM 小鼠($P<0.05$)。



a:$P<0.05$,与对照组同一基因型比较;;b:$P<0.05$,与相同处理组 $SERT^{+/+}$ 比较

图3 SERT 敲除小鼠血浆中皮质酮浓度测定

3 讨论

SERT 敲除小鼠是采用 neo 盒子替代 SERT 基因中第2个外显子得到的转基因小鼠,包括 $SERT^{+/-}$(SERT 的表达能力减低)和 $SERT^{-/-}$(没有 SERT 的表达)[9]。SERT 敲除小鼠,尤其是 $SERT^{+/-}$ 小鼠,与人类 s 携带者在许多方面都表现出相似性。例如,$SERT^{+/-}$ 小鼠与野生型小鼠相比显示 SERT 的表达降低50%,而人淋巴细胞培养中也发现,s 个体 SERT 的表达能力比 l 降低50%。同时,$SERT^{+/-}$ 小鼠和 s 携带者都表现出对5-HT 的再摄取能力轻微减弱[10-11]。在行为学研究方面,SERT 敲除小鼠和5-HTTLPR 短等位基因携带者一样,在应激条件下更容易产生神经质和焦虑[12-13]。轻微的刺激,例如握持和生理盐水注射,能显著的增加 ACTH 的分泌[14]。因此,SERT 敲除小鼠可作为研究5-HTTLPR 多态性导致对应激敏感性增加的细胞和分子机制的动物模型。本研究通过雌雄 $SERT^{+/-}$ 小鼠的交配产子,可成功获得3种基因型的同窝小鼠,使实验的可比性增强。

Dayas 等[15]把心理上的应激因子称为:"stimuli which threaten the individual's current or anticipated state"。本研究选用的 EPM 模型是公认致动物焦虑的温和、稳定、非条件反射应激原,在精神药理学研究中被广泛应用。该模型是利用开臂对动物来说具有一定的新奇性,同时又具有一定的威胁性,动物在产生探究好奇心的同时也会产生恐惧心理,形成动物的矛盾行为导致焦虑。实验指标以 OT% 和 OE% 反映动物的焦虑状态,焦虑动物的 OE% 和 OT% 明显降低。本实验结果显示:与 $SERT^{+/+}$ 小鼠相比,EPM 刺激下 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的 OT% 和 OE% 均显著性降低,提示 SERT 敲除小鼠在受到应激原刺激时更容易诱发焦虑状态。这与已经报道过 EPM 刺激下的 SERT 敲除小鼠焦虑类似性行为的结果一致[5,12]。另外,由于通过新异环境来刺激动物的应激反应是建立在陌生情景的前提之下,因此,陌生环境是至关重要的一个因素。为了保证 EPM 环境对各基因型小鼠的新异刺激,本实验各基因型小鼠都是独立设组,确保每只小鼠只跑1次迷宫,这样,便可尽可能避免小鼠因对迷宫环境的熟悉而引起的结果误差,增加了实验结果的可靠性。

应激是机体在受到各种强烈因素(即应激原)刺激时,体内出现以交感神经兴奋和垂体.肾上腺皮质分泌增多为主的一系列神经内分泌反应。下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal cortex,HPA)轴是重要的神经内分泌循环通路,它在机体对抗应激情况的生理调节中起着重要的作用。下丘脑的室旁核是 HPA 轴活动的起始部位。在受到应激刺激时,下丘脑室旁核(paraventricular nucleus,PVN)的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin-releasing factor,CRF)神经元分泌 CRF。CRF 经垂体门脉流到垂体,与垂体前叶的 CRF 1型受体结合,刺激分泌促 ACTH。后者经血液循环到达肾上腺,刺激肾上腺皮质合成和分泌皮质激素。分泌的皮质激素与其相应的受体结合,激活一系列的信号转导通路,改变效应基因的表达、促进相关蛋白质的合成,调节糖、脂质、蛋白质及水盐代谢和动员机体对抗应激反应。

通常,合理的应激原能引起 HPA 轴的正常反应。实验结果显示:5 min EPM 后,3种基因型小鼠 ACTH 和皮质酮分泌均出现增加,同时这种升高方式与基因型相关,其中 $SERT^{+/-}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠增加显著,提示 EPM 作为应激原是有效且合理的。并且 $SERT^{+/-}$

和 SERT$^{-/-}$ 小鼠 ACTH 的增加显著高于 SERT$^{+/+}$，SERT$^{-/-}$ 小鼠皮质酮分泌增加显著高于 SERT$^{+/+}$，提示 SERT 敲除小鼠的 HPA 轴对应激的反应更加敏感。这与已经报道过非标准刺激因子握持和生理盐水注射，都能显著增加 SERT$^{+/-}$ 和 SERT$^{-/-}$ 小鼠的 ACTH 的分泌结果一致[14]。这说明 SERT 敲除小鼠的 HPA 轴对实验采用的 EPM 应激原有反应。所以，对于研究 SERT 敲出小鼠 HPA 轴对应激反应增高的敏感性机制，EPM 是一种理想的、稳定的应激刺激因子。基础条件下 SERT 敲除小鼠 ACTH 的分泌与 SERT$^{+/+}$ 相比没有显著改变，但是 SERT$^{-/-}$ 小鼠的皮质酮分泌显著低于 SERT$^{+/+}$ 小鼠，可能是因为静息条件下 SERT$^{-/-}$ 小鼠肾上腺皮质的 ACTH 受体功能减弱导致的[14]，具体的分子机制是我们下一步研究的目的。

综上所述，我们采用 EPM 作为应激原刺激 SERT 敲除小鼠，能较为客观和准确地引起 SERT 敲除小鼠的焦虑类似行为和 HPA 轴的内分泌改变。因而，在研究 5-HTTLP 多态性致应激敏感性增加发生的机制及药物的治疗研究中，可以采用 SERT 作为动物模型，EPM 作为稳定的应激刺激因子。

参考文献：

[1] Lesch K P, Bengel D, Heils A, *et al*. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region[J]. Science, 1996, 274(5292): 1527 - 1531.

[2] Heils A, Teufel A, Petri S, *et al*. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression[J]. J Neurochem, 1996, 66(6): 2621 - 2624.

[3] Kazantseva A V, Gaysina D A, Faskhutdinova G G, *et al*. Polymorphisms of the serotonin transporter gene (5-HTTLPR, A/G SNP in 5-HTTLPR, and STin2 VNTR) and their relation to personality traits in healthy individuals from Russia[J]. Psychiatr Genet, 2008, 18(4): 167 - 176.

[4] 黎雪梅，况利. 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[J]. 第三军医大学学报，2009，31(5)：430 - 433.

[5] Holmes A, Murphy D L, Crawley J N. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression[J]. Biol Psychiatry, 2003, 54 (10): 953 - 959.

[6] Holmes A, Parmigiani S, Ferrari P F, *et al*. Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety[J]. Physiol Behav, 2000, 71(5): 509 - 516.

[7] Li Q, Brownfield M S, Levy A D, *et al*. Attenuation of hormone responses to the 5-HT1A agonist ipsapirone by long-term treatment with fluoxetine, but not desipramine, in male rats[J]. Biol Psychiatry, 1994, 36(12):300 - 308.

[8] Li Q, Levy A D, Cabrera T M, *et al*. Long-term fluoxetine, but not desipramine, inhibits the ACTH and oxytocin responses to the 5-HT1A agonist, 8-OH-DPAT, in male rats[J]. Brain Res, 1993, 630(1/2): 148 - 156.

[9] Bengel D, Murphy D L, Andrews A M, *et al*. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice[J]. Mol Pharmacol, 1998, 53(4): 649 - 655.

[10] Li Q. Cellular and molecular alterations in mice with deficient and reduced serotonin transporters[J]. Mol Neurobiol, 2006, 34(1): 51 - 66.

[11] Kalueff A V, Ren-Patterson R F, Murphy D L. The developing use of heterozygous mutant mouse models in brain monoamine transporter research[J]. Trends Pharmacol Sci, 2007, 28(3):122 - 127.

[12] Bartolomucci A, Carola V, Pascucci T, *et al*. Increased vulnerability to psychosocial stress in heterozygous serotonin transporter knockout mice[J]. Dis Model Mech, 2010, 3(7/8):459 - 470.

[13] Heiming R S, Jansen F, Lewejohann L, *et al*. Living in a dangerous world: the shaping of behavioral profile by early environment and 5-HTT genotype[J]. Front Behav Neurosci, 2009, 3:26.

[14] Jiang X, Wang J, Luo T, *et al*. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feedback regulation in serotonin transporter knockout mice[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(3):317 - 331.

[15] Dayas C V, Buller K M, Crane J W, *et al*. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(7):1143 - 1152.

（收稿：2011-07-06；修回：2011-10-26）

（编辑 王小寒）

《第三军医大学学报》部分编委、专家组稿座谈会成功举办

2011年12月18日《第三军医大学学报》编委、专家组稿座谈会在东泉镇秀泉映月酒店召开，参加会议的有本刊编委会常务副主任委员钱桂生教授及学校3所附属医院的14位临床专家。会议由钱桂生教授主持。

学报编辑部冷怀明主任首先汇报了2011年《第三军医大学学报》工作的基本情况、取得的荣誉、存在的问题和困难以及2012年的工作要点，并感谢各位专家教授多年来对学报工作的大力支持和帮助。到会专家一致肯定了学报在目前政策导向（鼓励向SCI收录期刊投稿）下所取得的优异成绩，并积极为学报2012年组稿工作献计献策。会上初步形成2个组稿意向：(1)肺癌的靶向治疗；(2)肝脏肿瘤治疗的新进展。

钱桂生教授在总结发言中指出：要办好学报需要编辑、编委和科研工作者共同努力，要把学报当成事业来办；组稿人的站位应高，组织的稿件水平要高，审稿专家要严格把关，以确保学报的质量。并希望学报今后多举办此类活动，积极与编委、专家沟通和交流，加强组稿、约稿工作，把学报越办越好。