文章编号:1000-5404(2012)13-1265-04

论著

FGF-2 和 VEGF 在慢性应激抑郁大鼠前额叶皮层表达

佗婷婷,冯正直,蒋 娟,涂 静,刘可愚,杜 征 (400038 重庆,第三军医大学护理学院心理学教研室)

[摘要] **目的** 探讨慢性应激抑郁大鼠前额叶皮层成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factors-2,FGF-2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达变化,分析其在抑郁症病理生理学中的意义。**方法** 20只体质量180~220 g雄性SD大鼠分为正常对照组(对照组)、慢性应激抑郁模型组(抑郁组),每组10只。利用21 d慢性不可预见性应激刺激(chronic unprediectable mild stress,CUMS)制造抑郁症模型。21 d后,采用敞箱实验(open-field behavior)、糖水消耗实验、摄食量和体质量增量等检测指标评定大鼠行为学改变并检测模型是否成功建立。应用Western blot法检测FGF-2和VEGF蛋白表达情况;荧光实时定量PCR技术检测目的基因mRNA表达情况。**结果** Western blot检测结果显示:抑郁组SD大鼠前额叶皮质层FGF-2(1.23±0.06)、VEGF蛋白表达(1.15±0.27)显著低于对照组($P<0.05$);rt-q PCR结果显示:与对照组相比,抑郁组SD大鼠前额叶皮质层FGF-2的$2^{-\triangle\triangle Ct}$值为0.47、VEGF的$2^{-\triangle\triangle Ct}$值为0.51,提示二者mRNA表达与对照组相比显著下调($P<0.05$)。**结论** FGF-2与VEGF基因在前额叶中的表达下调可能在抑郁症病理机制中发挥一定作用。

[关键词] 慢性应激抑郁大鼠模型;FGF-2;VEGF;前额叶皮质层
[中图法分类号] R322.81; R394.2; R749.41 [文献标志码] A

Expression of FGF-2 and VEGF in prefrontal cortex of chronic unprediectable mild stress rats

Tuo Tingting, Feng Zhengzhi, Jiang Juan, Tu Jing, Liu Keyu, Du Zheng (Department of Psychology, School of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the changes of the fibroblast growth factors-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the prefrontal cortex (PFC) of animal model of depression induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS), and to analyze the relationship of FGF-2 and VEGF expression with the etiology and pathophysiology of depression. **Methods** A total of 20 male Sprague-Dawley rats weighting 180 to 220 g were randomly divided into 2 groups, normal control group and model group, with 10 rats in each group. The depressed model was reduced by CUMS for 21 d. Then the behavior changes of rats were detected through open-field test, sugar consumption test, and body weighting and feeding, to identify the model establishment. The expression of FGF-2 and VEGF at mRNA and protein levels in the PFC were verified by using real-time-PCR and Western blotting. **Results** The protein expression of FGF-2 (1.23±0.06) and VEGF (1.15±0.27) in PFC were significantly lower in the model group than control group ($P<0.05$). And the mRNA levels of FGF-2 and VEGF in the PFC were also significantly lower in model group than control group ($P<0.05$). **Conclusion** Down-regulation of FGF-2 and VEGF in the PFC may play certain roles in the pathophysiological process of depression.

[**Key words**] chronic unprediectable mild stress; fibroblast growth factors-2; vascular endothelial growth factor; prefrontal cortex

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970898). Corresponding author: Feng Zhengzhi, E-mail: fengzhengzhi@gmail.com

抑郁症是以显著而持久的抑郁情感或心境改变为主要特征,与应激密切关联的一类精神疾病[1]。迄今为止,抑郁症的发病机制仍未完全阐明。文献[2]报道:基因与环境相互作用导致神经可塑性改变与抑郁症发病有显著相关。抗抑郁剂作用机制之一是大脑皮质的突触连接增强以及神经可塑性发生改变。FGF-2是成纤维细胞生长因子家族中的一员,具有促进神经组织损伤修复、神经保护和神经营养作用,在神经发生的早期就起到一定的作用[3]。在大脑发育过程中,FGF-2主要的

[基金项目] 国家自然科学基金(30970898)
[通信作者] 冯正直,E-mail:fengzhengzhi@gmail.com

作用是促进神经干细胞的增殖分化,而神经发生受阻、神经细胞萎缩和缺失则与抑郁症密切相关。VEGF 又称为血管生成因子,可以有效地促进血管再生以及内皮细胞的增殖[4]。研究表明,抑郁症患者急性发作期,VEGF 的水平有所增加[5];抗抑郁药物可增加海马的 VEGF 水平和内皮细胞增殖,这与抗抑郁作用有关,阻断 VEGF,导致神经发生消失,抗抑郁作用下降[6]。

同时,应激情境可引起机体神经精神系统功能失调甚至损伤,从而导致抑郁[7]。研究[8]发现,前额叶是应激情境易累及损伤的主要靶区。其功能的缺损是抑郁症发生的病理生理基础之一,因为此区域富含与其他大脑皮质、边缘系统和皮质下区的传入和传出纤维,所以它在调节、调整情感和情绪方面起着非常重要的作用[9]。因此,研究前额叶 FGF-2 和 VEGF 的表达对揭示抑郁症的发生机制有一定的理论和实践意义。

因此,本研究采用 CUMS 法建立抑郁症大鼠模型,运用 Western blot、Real-time PCR 法,在蛋白以及 mRNA 两方面探讨 FGF-2 和 VEGF 在前额叶的表达变化,以期为揭示抑郁症的病理生理机制提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物以及分组

SD 雄性大鼠 20 只,体质量 180~220 g[第三军医大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)2007-0003]。饲养于恒定温度为 22 ℃的室内环境中,日照与黑暗时间各为 12 h。首先饲养 7 d 以适应环境,大鼠分为正常对照组(对照组)、慢性应激抑郁模型组(抑郁组),每组 10 只。

1.2 造模方法

参照文献[10],并根据文献[11]的方法加以改进,抑郁模型组单笼饲养,进行 21 d 慢性轻度不可预见性应激刺激。包括禁水、禁食、夹尾、电击足底、冰水游泳、噪音刺激、转换昼夜节律、制动、热刺激。每天安排 1 种刺激,每种刺激重复 2~3 次。每种应激的具体操作方法如下:禁水 24 h;禁食 24 h;夹尾(将大鼠放入固定笼中,露出尾巴,用止血钳夹住距尾根部 1 cm 处,持续 1 min);电击足底(30 V 电压,电击 1 次/min,10 s/次,共 20 次);冰水游泳(将大鼠放入盛有 4 ℃冷水的桶中,水深 15 cm,大鼠的足尖刚能触及桶底,5 min 后将动物取出);昼夜节律转换(早上 8:00,将大鼠放入暗箱中,晚 8:00 至次日早 8:00 打开灯照明);制动(将大鼠放入固定笼中,持续 2 h);热刺激(将大鼠放入 40 ℃烘箱中,5 min 后取出)。对照组大鼠不予任何刺激,每 5 只 1 个笼子饲养。

1.3 抑郁模型大鼠行为学评价

评价抑郁模型是否成功建立主要有摄食量及体质量增加量的测量、敞箱实验、糖水偏爱度测定、强迫游泳实验、水迷宫实验。本研究根据研究条件以及研究目的选取前 3 种方法进行模型有效性测定。所谓模型有效性,是指造模前、后各项指标达到显著差异。

1.3.1 摄食量及体质量增加量的测量 分别于实验第 7、14、21 天早 8:00 加食物 100 g,次日早 8:00 称食物余量,计算 24 h 摄食量;分别于实验前(即第 1 天)、实验后(即第 21 天)称取每只大鼠的体质量。体质量增加量(g)=(实验后大鼠体质量-实验前大鼠体质量)。该检测指标模拟抑郁症患者食欲减退以及体质量减低症状。

1.3.2 敞箱实验(open-field-test)实验方法 敞箱装置为一无盖方箱,由不透明树脂材料制成,四周、底部均为白色,底面为 76 cm×76 cm 的正方形并被等分为 25 个等边方格,周壁高 42 cm。将大鼠置于中心方格内,观察大鼠在 2 min 内穿越格数(四爪均进入的方格方可记数,为水平运动得分)、后肢直立次数(两前爪腾空或攀附墙壁,为垂直运动得分)。其中水平运动减少反映了动物的活动度降低,垂直运动减少反映了动物对新鲜环境的好奇程度降低。每只大鼠进行 1 次测定,每次 2 min。由 2 位观察者打分,取 2 人的均值记录。每次操作后清洗实验装置,以免残留气味对下次实验造成影响。

1.3.3 糖水偏爱度测定 实验前 24 h 禁食禁水,首先测定 1 h 大鼠饮用 1% 蔗糖水和纯水量,然后应用公式计算出各组大鼠糖水偏爱度值。大鼠蔗糖水饮用量若出现显著的下降,而其总液体消耗量并无显著的改变,这并非是大鼠的渴觉下降,而是提示大鼠对幸福事件反应能力的下降。

糖水偏爱度值 = 1% 蔗糖水消耗量/(1% 蔗糖水消耗量 + 纯水消耗量)×100%

1.4 Western blot 法检测 FGF-2 和 VEGF 蛋白表达

实验结束后 24 h 内,将 2 组大鼠分别以戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉剂,迅速断头处死,在冷冻条件下迅速取全脑,分离前额叶皮层。迅速放入液氮罐中,后转移至 -80 ℃冰箱保存备用。分别取 2 组大鼠的前额叶皮层,取少量加 400 μl 裂解液(配制按碧云天公司提供的 RIPA 裂解液说明书进行)进行匀浆,冰上孵育 30 min,4 ℃、12 000×g 离心 5 min,收集上清液,上清液即为裂解的蛋白,Brandford 法进行蛋白定量。每孔上样 150 μg,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉溶液室温漂洗 2 h,分别加入一抗(FGF-2 抗体,ab106245,美国 Abcam 公司,1∶1 000 稀释;VEGF 抗体,ab46154,美国 Abcam 公司,1∶1 000 稀释)。TBST 洗膜后加二抗,常温孵育 1 h,TBST 洗膜后,ECL 化学发光试剂(美国 Amersham Pharmacia Biosciences 公司)检测阳性信号,采用 Scion Image 软件计算条带的相对光密度值。实验重复 3 次。

相对光密度值 = 实验组或对照组光密度值/β-actin 光密度值

1.5 rt-q PCR 检测 FGF-2 和 VEGF mRNA 的表达

取出 -80 ℃冰箱保存的前额叶皮层组织。Trizol 法提取总 RNA:取 300 mg 组织快速研磨至粉末状,装入 5 ml 离心管中。离心管中加入 4.5 ml Trizol 提取液。室温温育 5 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液移至新离心管,加 1 ml 氯仿用力摇动 15 s,室温放置 5 min,12 000 r/min 4 ℃离心 15 min。移上清液于新管,加 3 ml 异丙醇混匀,室温放置 15 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,加 1 ml 75% 乙醇洗涤,4 ℃ 7 500 r/min 离心 5 min。弃乙醇,空气中干燥 10 min,加适量 DEPC 水溶解总 RNA。反转录合成 cDNA,过程如下:65 ℃(1 min)→30 ℃(5 min)→65 ℃(25 min)→98 ℃(5 min)→5 ℃(5 min),从 30 ℃升温到 65 ℃时,在 15~30 min 内匀速升

温。Real-time PCR 过程按照试剂盒(东洋纺-上海生物科技有限公司)说明书操作。引物合成由生工生物工程(上海)有限公司完成,序列如下:FGF-2 上游引物 5′-CGGCTGCTGGCTTCTAAGTG-3′,下游引物 5′-GCCCCGTTTTGGATCCGAGTT-3′,扩增片段长度为 324 bp;VEGF:上游引物 5′-CCAGGAGTACCCCGATGAGATAG-3′,下游引物 5′-CTGGCTTTGGTGAGGTTTGATC-3′,扩增片段长度为 197 bp。以 β-actin(249 bp)作为内参对照,设计引物分别为:上游引物 5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游引物 5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCAT-3′。ΔΔCt =(ΔCt 样本 − ΔCt 内参) =(Ct1 − Ct2) −(Ct3 − Ct4)(Ct1:处理样品待测基因的临界循环数; Ct2: 处理样品持家基因的临界循环数; Ct3: 对照样品待测基因的临界循环数;Ct4: 对照样品持家基因的临界循环数),将所得的 ΔΔCt 值代入 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 中,即可得到最终定量结果。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,Western blot 的检测结果比较行独立样本 t 检验,组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 对照组与抑郁组大鼠行为学评价结果

2.1.1 两组大鼠敞箱实验、体质量增加量以及摄食量比较

结果如表 1 所示。抑郁组大鼠水平运动得分、垂直运动得分、总得分均低于对照组,且体质量增加量、摄食量也显著低于对照组($P<0.05$)。

表 1 慢性应激对大鼠行为、体质量增加量及摄食量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	水平运动得分(分)	垂直运动得分(分)	体质量增加量(g)	摄食量(%)
对照组	69.88 ± 2.09	13.46 ± 0.73	142.22 ± 3.09	16.46 ± 0.32
抑郁组	10.80 ± 0.94[a]	6.04 ± 0.49[a]	94.61 ± 2.37[a]	7.91 ± 0.21[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

2.1.2 两组大鼠液体消耗实验各项指标比较

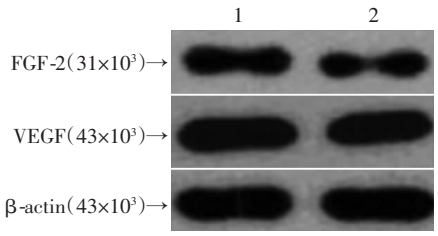
结果如表 2 所示。抑郁组大鼠糖水消耗量、纯水消耗量和 1% 糖水偏爱百分比在应激前与对照组相比无显著差异($P>0.05$),而应激后均明显低于对照组 ($P<0.05$)。

2.2 前额叶皮层 FGF-2 和 VEGF 蛋白表达结果

抑郁组 FGF-2 蛋白表达低于对照组[分别为(1.23 ± 0.06)、(1.79 ± 0.02),$P<0.05$];抑郁组 VEGF 蛋白表达低于对照组[分别为(1.15 ± 0.27)、(1.63 ± 0.07),$P<0.05$]。见图 1。

2.3 前额叶皮层 FGF-2 和 VEGF 基因 mRNA 的表达

结果显示,与对照组比较,抑郁组的前额叶皮质层的 FGF-2、VEGF mRNA 表达明显降低($P<0.05$)。见表 3。



1:对照组;2:抑郁组

图 1 Western blot 检测慢性应激后大鼠前额叶皮层 FGF-2、VEGF 蛋白的表达改变

表 3 FGF-2、VEGF mRNA 定量分析结果($n=10$)

指标	Ct 样本($\bar{x} \pm s$)	Ct 内参($\bar{x} \pm s$)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
FGF-2			
对照组	26.72 ± 0.13	20.95 ± 0.11	1.00
抑郁组	24.98 ± 0.17	20.73 ± 0.15	0.47[a]
VEGF			
对照组	26.34 ± 0.07	20.95 ± 0.11	1.00
抑郁组	24.95 ± 0.19	20.73 ± 0.15	0.51[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

本实验采用 CUMS 抑郁模型,其理论依据与人类抑郁症中慢性、轻度的应激导致抑郁症的机理极为相近。经过 21 d 不可预见慢性应激刺激后,实验结果显示,CUMS 大鼠糖水偏好率显著下降,表明此时动物对幸福事件反应能力的降低。体质量下降也是抑郁症的一个重要的症状。另外,旷场实验中大鼠水平运动的活动度显著减低,能够形象模拟人类生理运动的迟缓;垂直运动和自我修饰次数都降低表明“兴趣降低”,这与抑郁症临床诊断中的核心症状及主要躯体体征有相似性,提示了该模型的成功建立,并为下一步研究提供了实验基础。

在此基础上,本研究采用 Western blot 与 rt-q PCR 相结合的方法, 探讨 FGF-2 和 VEGF 在前额叶的蛋白以及 mRNA 表达变化。结果表明:在 CUMS 大鼠模型的前额叶脑区,抑郁组大鼠的 FGF-2 蛋白以及 mRNA 表达与对照组相比发生显著下调。提示抑郁可能导致 FGF-2 在前额叶表达下降。而 Turner 等[12] 采用氟西汀和非典型抗精神病药奥氮平短时联合注射,结果发现 FGF-2 mRNA 水平在前额叶皮质出现选择性上调。上述结果表明,慢性应激可导致 FGF-2 在前额叶表达下降,而抗抑郁治疗可逆转抑郁导致的 FGF-2 减低。其机制可能是 FGF-2 对应激有神经保护作用,增加 FGF-2

表 2 慢性应激对大鼠液体消耗实验各项指标的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	总液体消耗量(ml/ 24 h)		糖水消耗量(ml/ 24 h)		纯水消耗量(ml/ 24 h)		1% 糖水偏爱百分比(%)	
	应激前	应激后	应激前	应激后	应激前	应激后	应激前	应激后
对照组	16.54 ± 0.19	15.81 ± 0.21	12.53 ± 0.24	12.56 ± 0.37	3.07 ± 0.11	3.09 ± 0.09	74.86 ± 0.39	73.98 ± 0.37
抑郁组	15.85 ± 0.27	14.69 ± 0.24	11.82 ± 0.26	7.04 ± 0.17[a]	3.24 ± 0.09	6.63 ± 0.16	76.33 ± 0.41	51.05 ± 0.39[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

的表达能降低应激产生的不利影响以发挥神经保护和神经营养作用。研究还发现在CUMS大鼠模型的前额叶脑区,抑郁组大鼠的VEGF蛋白以及mRNA表达与对照组相比发生显著的下调。这与Evans等[13]的研究结果比较一致,其研究证明与健康对照组相比,抑郁症患者的VEGF水平降低。但最近有研究证实,处于抑郁状态的大鼠出现神经发生障碍以及神经细胞凋亡增加[14],而神经发生通常在丰富的脉管区或者其周围增加,这些部位的VEGF水平都非常高。而本实验采用CUMS法建立抑郁大鼠模型,在应激的作用下大鼠可能出现了神经发生受阻,从而导致前额叶周围的血管生成也受到一定影响,出现了前额叶的VEGF降低。FGF-2和VEGF在海马等脑区的相关研究发现二者在抑郁大鼠的海马脑区发生下调,与本研究结果较为一致,其原因可能是抑郁情绪累计及海马、前额叶、丘脑、扣带回等组成的边缘系统,从而导致该系统中前额叶与海马的FGF-2和VEGF均出现不同程度的下调。

本研究结果表明,慢性应激可导致大鼠前额叶FGF-2和VEGF的共同下降。其原因可能有以下几方面:①抑郁症是一种复杂的异质性疾病,FGF-2和VEGF可能共同通过影响细胞机能,引起大脑结构与功能变化从而导致抑郁。②CUMS大鼠前额叶FGF-2和VEGF共同下降可能是慢性应激导致神经元受损,神经再生受到抑制,中枢神经系统平衡被破坏,导致前额叶体积下降,功能受损,从而产生抑郁。③FGF受体激活后通过酪氨酸激酶进行细胞内的信号传递,而VEGF的胞内信号传导通路也是通过酪氨酸激酶进行的。抗抑郁治疗能上调FGF-2和VEGF,可能是二者结合在一起相互作用激活了酪氨酸激酶受体,形成了信号转导通路。那么FGF-2和VEGF的相互作用是否能够拮抗抑郁的发生呢?Seki[15]研究结果表明上述两种生长因子均有促进血管生成的作用,FGF-2和VEGF施加复合作用可以导致大脑血管系统功能增加。FGF-2和VEGF的相互作用对抑郁症的发生、发展产生哪些影响?二者在抑郁症发病中的相互关系究竟如何,亦十分值得做进一步研究。

综上所述,FGF-2和VEGF的蛋白和mRNA都在CUMS大鼠模型的前额叶皮质层发生了表达下调。这一结果提示,二者可能通过抑制神经发生以及血管生成影响抑郁的发生,或者通过激活酪氨酸激酶信号转导通路,进而发挥抗抑郁作用。抑郁症发生的病理生理机制十分复杂,涉及不同脑区、多种基因以及众多的神经回路。本研究仅对其中两个靶点进行探讨,而要揭示抑郁症的发生机制还需进行深入研究,比如利用非人类的灵长类动物建立抑郁模型,以期在抑郁症的病因学研究中有新的突破。

参考文献:

[1] 尹烈虎, 李学成, 陆地, 等. 抑郁模型大鼠脑脊液、海马和皮层组织脑源性神经营养因子的变化[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 230-232.

[2] Duman R S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders[J]. Neuromolecular Med, 2004, 5(1): 11-25.

[3] Yoo K Y, Hwang I K, Lee C H, *et al*. Difference of fibroblast growth factor receptor 1 expression among CA1-3 regions of the gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia[J]. J Neurol Sci, 2010, 296(1/2): 13-21.

[4] Nowacka M M, Obuchowicz E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action[J]. Neuropeptides, 2012, 46(1): 1-10.

[5] Lee B H, Kim Y K. Increased plasma VEGF levels in major depressive or manic episodes in patients with mood disorders[J]. J Affect Disord, 2012, 136(1/2): 181-184.

[6] Fabel K, Tam B, *et al*. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(10): 2803-2812.

[7] Lupien S J, McEwen B S, Gunnar M R, *et al*. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(6): 434-445.

[8] McEwen B S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain[J]. Dialogues Clin Neurosci, 2006, 8(4): 367-381.

[9] Marzo A, Bai J, Caboche J, *et al*. Cellular mechanisms of long-term depression induced by noradrenaline in rat prefrontal neurons[J]. Neuroscience, 2010, 169(1): 74-86.

[10] Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1992, 16(4): 525-534.

[11] 周明芳, 冯正直, 程天民. 慢性应激抑郁复合皮肤创伤对大鼠行为及体重的影响[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(2): 154-156.

[12] Turner C A, Calvo N, Frost D O, *et al*. The fibroblast growth factor system is downregulated following social defeat[J]. Neurosci Lett, 2008, 430(2): 147-150.

[13] Evans S J, Choudary P V, Neal C R, *et al*. Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(43): 15506-15511.

[14] Sung Y H, Shin M S, Cho S, *et al*. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus[J]. Neurosci Lett, 2010, 470(1): 86-90.

[15] Seki T. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis[J]. Anat Sci Int, 2003, 78(2): 69-78.

(**收稿**:2011-12-06;**修回**:2012-01-11)

(编辑 王小寒)