

【基础研究】

通信作者:王长虹(1963-),男,河南卫辉人,博士,教授,研究方向:应激与心理行为障碍;E-mail:wangchdr@163.com

three groups before modeling ($P > 0.05$). There was no significant difference in the horizontal movement score and vertical movement score of rats in open field test, and the latency in dark avoidance test before modeling, after modeling and after intervention in the control group ($P > 0.05$). Compared with before modeling, the horizontal movement score and vertical movement score of rats reduced in open field test ($P < 0.05$), and the latency prolonged in dark avoidance test in the depression group and duloxetine group after modeling ($P < 0.05$). There was no significant difference in the behavioral indexes of rats between the depression group and duloxetine group after modeling ($P > 0.05$). Compared with the control group, the body mass of rats decreased, the horizontal movement score and vertical movement score of rats reduced in open field test ($P < 0.05$), and the latency prolonged in dark avoidance test in the depression group and duloxetine group after modeling ($P < 0.05$). Compared with after modeling, the body mass of rats decreased, the horizontal movement score and vertical movement score of rats increased in open field test ($P < 0.05$), and the latency shortened in dark avoidance test in the duloxetine group after intervention ($P < 0.05$). Compared with the depression group, the horizontal movement score and vertical movement score of rats increased in open field test ($P < 0.05$), and the latency shortened in dark avoidance test in the duloxetine group after intervention ($P < 0.05$). The methylation status of CpG island in the promoter region of S100B protein gene was not present in the hippocampus and prefrontal cortex of rats in the three groups. **Conclusion** Duloxetine can significantly improve the behavioral performance of depression rats, which may not be related to the methylation status of S100B gene in hippocampus and prefrontal cortex.

Key words: depression; duloxetine; hippocampus; prefrontal cortex; S100B gene; methylation

随着生活压力的增加,抑郁症发病率越来越高,据统计,到 2020 年抑郁症将成为全球第 2 大致残性疾病^[1-2],但目前其发病机制尚不明确。研究发现,神经胶质细胞在抑郁症尤其是难治性抑郁症的发病中起到重要作用^[3-4],而 S100B 作为神经胶质细胞的主要标志物,被认为是抑郁症的筛选指标,且是表观遗传的重要基因^[5]。表观遗传学是研究在无细胞核 DNA 序列改变的情况下,基因功能的可逆的、可遗传的改变,DNA 甲基化是其最重要的表观遗传修饰方式之一。最近的研究显示,S100B 蛋白表达变化可能取决于 S100B 基因调控区的 DNA 甲基化程度^[6],而关于 S100B 基因甲基化在抑郁症治疗中的作用尚未见报道。度洛西汀为常用的抗抑郁剂,研究显示,其能够激活抑郁模型大鼠海马和前额叶皮层 S100B 蛋白活性^[7]。本研究通过对大鼠进行慢性不可预见性温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立抑郁模型,以选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)度洛西汀为干预药物,从表观遗传学层面探讨 S100 基因甲基化在度洛西汀治疗抑郁症中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只清洁级雄性 Sprague-Dawle 大鼠,体质量 200 ~ 300 g,喂养于湿度 40% ~ 50%、温度(24 ± 1)℃的独立通气笼系统,自由摄食、水。大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001,质量合格证号:11400700139232。

1.2 药物、试剂与仪器 盐酸度洛西汀肠溶胶囊

(美国礼来亚洲公司,批准文号:H20150287),血液基因组 DNA 提取试剂盒 DP304(北京天根生化科技有限公司),引物合成、SK2072-N 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司),D5005 DNA 甲基化修饰试剂盒(美国 Zymo 公司),DL500DNA Marke(大连宝生工程科技有限公司);CH20 光学显微镜(日本 Olympus 公司),DM2000 图像采集系统(德国徕卡公司),大鼠 DBA-2 型程控避暗箱(上海软隆科技发展有限公司),ZF-1B 紫外透射分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 30 只大鼠采用随机数字表法分为对照组、抑郁症组和度洛西汀组,每组 10 只。

1.3.2 抑郁症大鼠模型制作 抑郁症组和度洛西汀组大鼠均孤养,并给予 42 d CUMS,制备抑郁症模型;对照组大鼠以每笼 3 只正常环境饲养 6 周,不给予 CUMS。CUMS 包括:电击足底(电压 60 V,电流 1 mA,每次 15 s,间隔 35 s 刺激 1 次,共 20 次)、摇晃鼠笼(频率为 1 次 · s⁻¹, 10 min)、强迫游泳(水温 4℃,水深约 35 mm,每次 5 min,每日 1 次)、夹尾(使用大卵圆钳夹住大鼠尾部近体 1/3 处,每次 2 min)、热应激(大鼠装入狭口瓶置于 45℃恒温箱 5 min)、禁食 24 h、禁水 24 h、噪音刺激(1 500 Hz, 95 dB,每日 1 h)、潮湿垫料 24 h(将 260 mL 水加入有锯末的鼠笼)、120 min 行为限制(将大鼠的头部置于行为限制筒的开口端,不可影响其呼吸)。以上各种刺激随机排列,每种刺激使用少于 3 次,且同种刺激不可以连续出现,使大鼠不能预测刺激的发生。

1.3.3 药物干预 度洛西汀组大鼠于实验第 22 ~ 42 天的 7:30 给予度洛西汀 $7.5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (溶于 1 mL 生理盐水中)灌胃,连续治疗 21 d。对照组和抑郁症组大鼠不给予任何干预。

1.4 观察指标

1.4.1 大鼠行为学评估 分别于造模前(实验前)、造模后(实验第 21 天)及药物干预后(实验第 42 天)对 3 组大鼠进行体质量测定、旷场实验及避暗实验,评估大鼠行为学变化。(1)体质量。(2)旷场实验:先将大鼠放入场箱正中的方格内,观察并记录 5 min 内大鼠水平运动和垂直运动评分。大鼠穿越底面方格数为水平运动分数,4 只爪均进入同一个方格内计 1 分,但若大鼠沿着线走,每走 10 cm 计 1 分。以大鼠后肢直立次数为垂直运动分数,大鼠 2 只前爪抬起或抓附箱壁,离开箱底 1 cm 为准,待大鼠放下前爪才可计 1 分。旷场实验于 8:00 ~ 12:00 进行,保持房间安静,每次都由相同的 2 人观察记录。每只大鼠观测后要打扫干净箱底,才可进行下一只大鼠的观测。(3)避暗实验:大鼠 DBA-2 型程控避暗箱有 2 间反应箱,可分为明箱和暗箱,箱间隔板上有 1 个直径 3 cm 的圆形洞口,明箱和暗箱底部都装有铜栅,暗箱底部铜栅通 36 V 的电刺激,明箱底部则不通电,训练时将大鼠放入明室中,先适应环境 3 min,然后通电,大鼠因嗜暗性钻入暗室进而遭受到电击,此时大鼠可从暗室自行逃回明室,获得记忆,如此训练 5 min;24 h 后重新开始测试,测试时先通电,然后将大鼠放入明室,同时开始计时间,记录从大鼠放入明室至第 1 次进入暗室遭到电击的时间(即为潜伏期)。

1.4.2 DNA 甲基化的检测 (1)标本采集:3 组大鼠最后一次行为评估后给予 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛 ($3\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉,将其固定在手术台上,快速断头,取右半球海马和前额叶皮质组织置入收集管中,液氮中保存,备用。(2)提取样品基因组 DNA:液氮冰冻研磨组织样品后经反复离心,最后收集溶液于 EP 管中,提取的 DNA 样本于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。(3)基因组 DNA 的亚硫酸氢盐修饰:将 $20\text{ }\mu\text{L}$ DNA 样品和 $130\text{ }\mu\text{L}$ CT Conversion reagent 添加到 PCR 管中,充分混匀, $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2.5 h,添加 $600\text{ }\mu\text{L}$ 的 M-结合缓冲液至 Zymo-Spin IC 柱中,将 Zymo-Spin IC 柱放入收集管中,充分混合样品,全速 ($>10\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 离心 30 s,除去流出液,添加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 M-洗涤缓冲液 (M-Wash Buffer) 到 Zymo-Spin IC 柱中, $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s,

添加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 M-脱磺化缓冲液至 Zymo-Spin IC 柱中,室温 ($20\sim30\text{ }^{\circ}\text{C}$) 下放置 15 ~ 20 min,培养后 $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s,再重复 2 次添加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 M-洗涤缓冲液到 Zymo-Spin IC 柱中, $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s,最后添加 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 M-洗脱缓冲液到 Zymo-Spin IC 柱基质中,将 Zymo-Spin IC 柱放置于 1.5 mL 的离心管中, $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s 洗脱 DNA;处理过的 DNA 可立即进行分析或 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。(4)甲基化特异性 PCR:S100B 甲基化特异性引物序列:上游为 5'-TTAGTTTTAGT-TACGGATAGATGCG-3',下游为 5'-CACAAAAA-AATACTAAAAATCGAA-3';S100B 非甲基化特异性引物序列:上游为 5'-TAGTTTTAGTTATGGATAGAT-GTGG-3',下游为 5'-CACAAAAAAAATACTAAAAAT-CAAA-3'。PCR 总反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$, Sterilized ddH_2O $25\text{ }\mu\text{L}$, $2 \times \text{PCR Master}$ $22\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 上游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$, 下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s,共 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。(5) $25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳:PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 40 min,经紫外透射分析仪观察电泳结果,DM2000 图像采集系统摄取图像,实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据经方差齐性检验,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠行为学指标比较 结果见表 1。造模前 3 组大鼠行为学指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组大鼠造模前、造模后及干预后旷场实验中水平运动评分、垂直运动评分及避暗实验中潜伏期比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与造模前比较,造模后抑郁症组、度洛西汀组大鼠旷场实验中水平运动评分、垂直运动评分减少,避暗实验中潜伏期延长,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。造模后抑郁症组与度洛西汀组大鼠行为学指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较,造模后抑郁症组、度洛西汀组大鼠体质量降低,旷场实验中水平运动评分、垂直运动评分减少,避暗实验中潜伏期延长,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与造模后比较,干预后度洛西汀组大鼠旷场实验中水平运动评分、垂直运动评分增加,潜伏期缩短,差

异均有统计学意义($P < 0.05$)。与抑郁症组比较,干预后度洛西汀组大鼠体质量及旷场实验中水平运动评分、垂直运动评分增加,潜伏期缩短,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

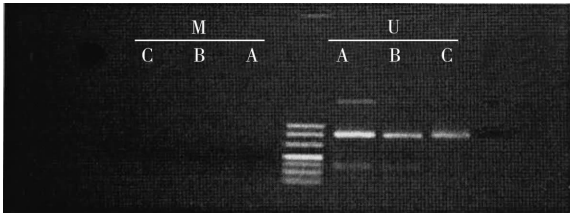
表 1 3 组大鼠行为学表现比较

Tab.1 Comparison of the behavioral performance of rats in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g	水平运动 评分	垂直运动 评分	潜伏期/s
对照组	10				
造模前		201.2 ± 7.8	87.9 ± 5.4	23.3 ± 3.9	13.1 ± 5.3
造模后		296.7 ± 10.1	91.8 ± 4.9	24.3 ± 6.2	18.2 ± 7.1
干预后		395.0 ± 8.2	85.3 ± 8.0	23.4 ± 4.3	13.1 ± 8.0
抑郁症组	10				
造模前		205.2 ± 6.4	89.6 ± 7.3	22.3 ± 4.1	12.4 ± 8.6
造模后		267.1 ± 6.4 ^a	14.1 ± 5.3 ^{ab}	12.3 ± 5.1 ^{ab}	75.4 ± 10.0 ^{ab}
干预后		321.3 ± 9.1 ^a	9.2 ± 6.1 ^a	6.9 ± 4.1 ^a	76.4 ± 8.8 ^a
度洛西汀组	10				
造模前		204.4 ± 6.6	90.0 ± 6.8	22.1 ± 4.8	11.4 ± 8.7
造模后		254.8 ± 5.3 ^a	13.4 ± 5.7 ^{ab}	13.1 ± 4.3 ^{ab}	78.7 ± 9.3 ^{ab}
干预后		364.8 ± 12.0 ^c	85.8 ± 5.2 ^{cd}	22.2 ± 6.1 ^{cd}	42.9 ± 6.1 ^{cd}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与造模前比较^b $P < 0.05$;与抑郁症组比较^c $P < 0.05$;与造模后比较^d $P < 0.05$ 。

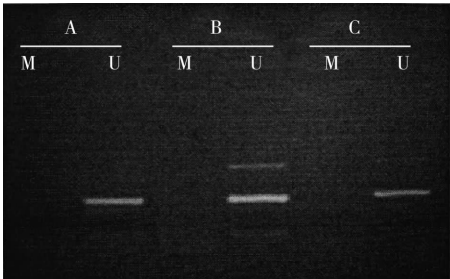
2.2 3 组大鼠海马及前额叶皮质中 S100B 基因甲基化比较 结果见图 1 和图 2。3 组大鼠海马及前额叶皮质中所提取的 S100B 基因均未检出甲基化条带。



注:M:甲基化;U:非甲基化;A:对照组;B:抑郁症组;C:度洛西汀组。

图 1 3 组大鼠海马组织中 S100B 基因甲基化

Fig.1 Methylation of S100B gene in the hippocampus of rats in the three groups



注:M:甲基化;U:非甲基化;A:对照组;B:抑郁症组;C:度洛西汀组。

图 2 前额叶皮质中 S100B 基因甲基化

Fig.2 Methylation of S100B gene in the prefrontal cortex of rats in the three groups

3 讨论

抑郁症的发病机制主要与单胺类神经递质减少、下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能紊乱、神经营养因子分泌失调、炎症反应等因素有关,但其确切机制尚不明确^[8]。研究表明,各种应激性生活事件特别是长期的慢性压力与抑郁症的发生有一定的正相关性^[9],而抗抑郁剂可以纠正这种抑郁症状^[10]。

目前,国内外广泛应用 CUMS 制备抑郁症动物模型,使其发病机制与人类抑郁症更加相近^[11]。本实验结果显示,CUMS 刺激 21 d 后,大鼠表现出体质量增长缓慢、运动能力下降、学习和记忆能力下降(避暗实验潜伏期延长)等抑郁症表现,表明成功建立了抑郁模型。与抑郁症组比较,度洛西汀组大鼠在造模成功后干预 21 d,其运动能力增强,学习和记忆能力提高,表明抑郁症表现得到改善,说明度洛西汀能够改善抑郁模型大鼠的行为学表现。

S100B 主要由神经胶质细胞分泌,CUMS 可造成神经元损伤并使 S100B 表达升高,影响海马及前额叶皮层的神经再生及可塑性,这种影响在有利的环境中可增强治疗效果,在恶劣的环境中可增加精神疾病的风险^[12]。RONG 等^[13]研究认为,S100B 蛋白可能通过影响星形胶质细胞分泌而在抑郁症发生及抗抑郁剂治疗中发挥重要作用。但有研究者认为,S100B 表达升高虽然可能是重度或急性抑郁症的生物学标志物,但其水平可能与抑郁症的严重程度无相关性,治疗后 S100B 表达水平有相应的波动,但并不能反映治疗的临床疗效变化^[14-16]。王国栋等^[17]研究认为,抗抑郁剂可以逆转抑郁大鼠海马组织内 S100B 高表达,但并非其抗抑郁作用机制。

越来越多的研究表明,DNA 甲基化与抑郁症有密切的关系,SONG 等^[18]研究发现,抑郁症患者脑源性神经营养因子基因的 DNA 甲基化状态发生了显著变化,特别是在外显子启动子区,说明该基因的 DNA 甲基化可能是诊断抑郁症的一种生物标志物。LESNIAK 等^[6]研究发现,S100 蛋白表达变化可以反映特殊类型的癌症,被认为是恶性肿瘤状态标志物,且 S100 蛋白表达变化可能取决于 S100 基因调控区的 DNA 甲基化程度。本研究结果显示,抑郁症组及度洛西汀组大鼠前额叶皮质与海马组织中 S100B 基因经甲基化特异性聚合酶链反应后均未检出甲基化状态,提示 CUMS 诱导的抑郁大鼠在相应干预后

S100B 基因的转录未受甲基化的影响,即其 S100B 基因的转录活性可能未受到甲基化抑制,而 S100B 基因对应的受体的活性很可能是正常的。因此本研究推断,以度洛西汀为代表的 SSRI 类抗抑郁药虽然可以改善早期 CUMS 大鼠海马及前额叶皮质组织中 S100B 蛋白的活性^[7],但很可能不是通过改变海马及前额叶皮质组织中 S100B 蛋白编码基因启动子区 CpG 岛甲基化而发挥效用。由于 DNA 甲基化可能与组织的特异性有相应的关联性^[19],因此,关于 S100B 在抑郁症发病及治疗中的具体机制尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] COOPER S L, GRAHAM A W, GOSS C W, *et al.* Unhealthy and unsafe practices associated with symptoms of depression among injured patients[J]. *Int J Inj Contr Saf Promot*, 2011, 18(3): 243-248.

[2] SONG X, LI N, LIU J, *et al.* Depression and its influencing factors among mothers of children with birth defects in China[J]. *Matern Child Health J*, 2012, 16(1): 1-6.

[3] KIM Y K, NA K S. Role of glutamate receptors and glial cells in the pathophysiology of treatment-resistant depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, 70: 117-126.

[4] RAJEWSKA-RAGER A, PAWLACZYK M. The role of S100B protein as a potential marker in affective disorders[J]. *Psychiatr Pol*, 2016, 50(4): 849-857.

[5] GULEN B, SERINKEN M, EKEN C, *et al.* Serum S100B as a surrogate biomarker in the diagnoses of burnout and depression in emergency medicine residents[J]. *Acad Emerg Med*, 2016, 23(7): 786-789.

[6] LEŚNIAK W. Epigenetic regulation of S100 protein expression[J]. *Clin Epigenetics*, 2011, 2(2): 77-83.

[7] 杨坤,于雪,王敬兰,等. 度洛西汀对早期应激模型大鼠行为及海马和前额皮层星形胶质源性蛋白表达的影响[J]. 中国慢性病预防与控制, 2015, 23(5): 331-334.

[8] 庞珍珍,詹合琴,陈正跃,等. 甜叶菊正丁醇提取物对抑郁小鼠肝脏单一免疫球蛋白白介素 1 受体相关蛋白和核转录因子 κ B 表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(19):

1480-1483.

[9] 赵幸福,徐一峰. 生活事件和抑郁症[J]. 上海精神医学, 1995, 7(3): 209-211.

[10] WILLNER P. Validation criteria for animal models of human mental disorders; learned helplessness as a paradigm case[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1986, 10(6): 677-690.

[11] 赵利芹,李晏,邵秋静,等. 丰富环境对抑郁大鼠行为学及海马组织中丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1 表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(9): 798-802.

[12] BUSEHERT J, HOHOFF C, TOUMA C, *et al.* S100B overexpression increases behavioral and neural plasticity in response to the social environment during adolescence[J]. *J Psychiatr Res*, 2013, 47(11): 1791-1799.

[13] RONG H, WANG G, LIU T, *et al.* Chronic mild stress induces fluoxetine-reversible decreases in hippocampal and cerebrospinal fluid levels of the neurotrophic factor S100B and its specific receptor [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(12): 5310-5322.

[14] FANG Y, XIAO S F, ZHANG S Y, *et al.* Increased plasma S100B level in patients with major depressive disorder[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(3): 248-250.

[15] TSAI M C, HUANG T L. Increased activities of both superoxide dismutase and catalase were indicators of acute depressive episodes in patients with major depressive disorder [J]. *Psychiatry Res*, 2016, 235(1): 38-42.

[16] AMBRÉE O, BERGINK V, GROSSE L, *et al.* S100B serum levels predict treatment response in patients with melancholic depression [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(3): 1-9.

[17] 王国栋,董娇,李晏,等. 慢性应激抑郁模型大鼠海马组织 S100B 表达及氟西汀的干预作用[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2013, 22(11): 978-981.

[18] SONG Y, MIYAKI K, SUZUKI T, *et al.* Altered DNA methylation status of human brain derived neurotrophin factor gene could be useful as biomarker of depression[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2014, 165(4): 357-364.

[19] MALUP T K, KOBZEV V F, ZHDANOVA L G, *et al.* Methylation of CpG dinucleotides in the promoter region of the gene encoding the S100B protein in BALB/cLac mice[J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2007, 412(1): 1-3.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)