

# 慢性应激抑郁模型大鼠脑内一氧化氮含量的变化

李惠春<sup>1</sup> 陈巧珍<sup>1</sup> 钱  烈<sup>2</sup>

( 1. 浙江大学医学院 附属第二医院精神科 浙江 杭州 310009 ;  
2. 杭州市萧山第一人民医院精神科 浙江 杭州 311200 )

[ 摘  要 ] 目的 观察慢性应激( chronic mild stress ,CMS )抑郁模型大鼠局部脑区一氧化氮( nitric oxide ,NO )含量的变化 ,结合行为学改变 ,探讨抑郁的发病机理。方法 :将 16 只成年雄性 Sprague – Dawley( SD )大鼠随机分为对照组和慢性应激模型组 ,以大鼠体质量及行为学改变来确保模型的可靠性 ,用分光光度法分别检测 2 组大鼠额叶和海马一氧化氮的含量。结果 :慢性应激模型组大鼠活动能力下降 ,兴趣丧失 ,与临床抑郁症的精神抑制症状相似 ,且额叶和海马 NO 含量[ 分别为 ( 31. 00 ± 2. 55 )和( 38. 11 ± 1. 73 )nmol/mg · pro ]明显高于对照组[ 分别为( 26. 97 ± 1. 38 )和( 36. 06 ± 0. 87 )nmol/mg · pro ]  $P < 0. 05$ 。结论 :研究结果提示额叶和海马 NO 通路代谢异常可能与抑郁症的发生有关。

[ 关键词 ] 抑郁症/病理生理学 ; 一氧化氮/血液 ; 额叶/代谢 ; 海马/代谢 ; 慢性应激抑郁模型 ; 大鼠

[ 中图分类号 ] R 749. 4      [ 文献标识码 ] A      [ 文章编号 ] 1008 – 9292( 2007 )02 – 0150 – 05

## Chronic mild stress stimulates nitric oxide production in rat brain cortex and hippocampus

LI Hui – chun ,CHEN Qiao – zhen ,QIAN Lie ( *Department of Psychiatry ,The Second Affiliated Hospital , College of Medicine ,Zhejiang University ,Hangzhou 310009 ,China* )

[ Abstract ] **Objective** :To evaluate the nitric oxide( NO ) levels in rat brain cortex and hippocampus after chronic mild stress. **Methods** :Sixteen male Sprague – Dawley rats were allocated into control group and model group randomly. Model rats were induced by consecutive chronic mild stress ;weight gain ,open field test and sucrose solution consumption were investigated before and after procedure. Nitric oxide contents in prefrontal cortex and hippocampus were determined by spectrophotometric assays. **Results** :Decreased locomotion ,loss of interest and anhedonia were observed in chronic mild stress rat model group. Nitric oxide contents in prefrontal cortex and hippocampus were significantly higher in chronic mild stress group [ ( 31. 00 ± 2. 55 )nmol/mg · pro and ( 38. 11 ± 1. 73 )nmol/mg · pro ,respectively ] than those in control group [ ( 26. 97 ± 1. 38 )nmol/mg · pro and ( 36. 06 ± 0. 87 ) nmol/mg · pro ,respectively ] (  $P < 0. 05$  ). **Conclusion** :Chronic stress can stimulate NO release ,and dysfunction of nitric oxide pathway may be involved in development of depression.

[ Key words ] Depression/pathophysiol ; Nitric oxide/blood ; Frontal lobe/metab ; Hippocampus/metab ; Chronic mild stress model of depression ; Rats

[ J Zhejiang Univ ( Medical Sci ) , 2007 36( 2 ) :150 - 154. ]

一氧化氮( nitric oxide , NO )作为一种重要的信使分子 ,广泛参与了生物体内的各种病理生理过程 ,它与中枢各种神经递质之间的关系受到了医学界的普遍关注<sup>[1]</sup>。近来 ,抑郁的发生也被认为与 NO 密切相关 ,已有研究发现急性应激可引起脑内包括 NO 在内的多种神经递质和神经内分泌的改变<sup>[2-4]</sup> ,然而这些研究主要集中于急性应激模型中 ,它并不能真正反映抑郁症。慢性应激抑郁模型采用多种刺激的方法来模拟人类抑郁症的核心症状 ,即快感缺乏以及一些神经内分泌、睡眠觉醒周期的变化 ,具有较好的效果 ,国内外学者对其可靠性都作了详细的描述<sup>[5-6]</sup>。在中枢神经系统中 ,额叶和海马是与情绪密切相关的重要脑区 ,所以 ,我们的实验建立了慢性应激模型 ,结合大鼠建模前后的各种变化 ,以探讨额叶、海马 NO 在慢性应激所致抑郁脑损害过程中的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 NO 测试盒由南京建成生物工程研究所提供 ;蛋白定量试剂购于 Bio - Rad 公司 ;小牛血清白蛋白( BSA ) 购于 New England 公司 ,其它试剂均为国产分析纯。所用仪器主要包括电子天平、Kinematica 组织匀浆仪、Eppendorf 高速冷冻离心机、HEWLETT PACKARD 紫外分光光度仪、Opsys MR 酶标仪等。

1.2 实验动物 成年雄性清洁级 SD 大鼠 16 只 ,体重 250 ~ 300 g 购于浙江大学医学院实验动物中心( 合格证号 2001001 )。实验前适应性饲养一周 ,期间自由进食、饮水 ,保持室内通风 ,室温维持在( 22 ± 2 )℃ ,给予 12 h 光照/12 h 黑暗( 光照时间为 7: 00 ~ 19: 00 )。

1.3 大鼠慢性应激抑郁模型的制备 依照参考文献<sup>[6]</sup>的方法并略作改进。大鼠适应一周后 ,将动物根据体重排序后根据随机数字表进行区组随机化 ,分为模型组和对照组 ,每组各 8

只。对照组自由饮水摄食 ;模型组大鼠单笼饲养于 25 cm × 14 cm × 17 cm 的笼中 ,连续接受低强度刺激 ,包括倾斜鼠笼 45°、禁水不禁食、配对饲养( 每次为同一对大鼠互换鼠笼 )、潮湿环境( 100 g 垫料中加入 200 ml 水 )、禁食不禁水、间断光照( 明暗交替/2 h ) ,每次 12 h ,循环 6 次 ,共持续 18 d。建模前后分别称量动物体重 ,并进行蔗糖消耗实验和敞箱实验。

1.3.1 蔗糖消耗实验( sucrose solution consumption test ) :剥夺食物和水 12 h 后给予质量分数为 1% 的蔗糖水溶液 ,称量 12 h 内蔗糖水的摄入量 ,以每千克动物摄入蔗糖水重量计算( g/kg )来计算。建模前后分别测一次。同时称量建模前后大鼠体重的变化 ,每次均在上午 7: 00 进行。

1.3.2 敞箱实验( Open field test ) :实验装置为高 40 cm、底边长 80 cm、内壁涂黑的无盖方箱 ,底板用白线划成 16 cm × 16 cm 的 25 个方格 ,上方挂一 60W 的红灯 ,正上方 2 m 处架一摄像机 ,镜头对准箱底。实验在安静环境下进行 ,将大鼠小心置于方箱底面中心 ,同时进行摄像和计时。2 min 后停止摄像 ,更换动物继续实验。两者之间用体积分数为 10% 的酒精清洗方箱周壁及底面 ,以免上次动物余留的异味影响下次实验结果。计分方法 通过放像设备 ,观察大鼠 2 min 内越过的方格数( 大鼠 4 只脚均在同一格子内为一格 )为水平得分( Crossing score ) ,穿越一格计 1 分 ;后肢站立次数为垂直得分( Rearing score ) ,双足离地一次计 1 分 ;两者之和为敞箱总得分。此项实验均在上午 10 : 00 ~ 12: 00 之间进行。

1.4 指标的检测

1.4.1 样品前处理 : 2 组大鼠在安静、无麻醉下断头取脑 ,在冰面上迅速分离大脑皮层和海马 ,锡箔纸包好液氮冷冻后置于 - 80℃ 冰箱中待测。临用时用预冷的生理盐水冲洗脑组织的表面去除血迹 ,然后加入预冷的缓冲液( 10

mmol/L Tris · HCl ,320 mmol/L 蔗糖 ,pH 7.4 ) 中 ,用 Kinematica 组织匀浆仪在冰上充分匀浆 ,高速冷冻离心机 700 g 4℃ 下离心 10 min ,除去核与碎片 ,留上清。

1.4.2 组织蛋白定量 :称取一定量的小牛血清白蛋白 ,梯度稀释制作蛋白标准曲线 ,取各样本上清用 BIO - RAD 法在酶标仪上检测各组织样品的蛋白浓度。

1.4.3 组织 NO 含量的测定 :由于 NO 在生物体内的含量低 ,化学性质活泼 ,体内代谢立即转变为稳定的  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  ,通常可采用硝酸还原酶法特异性地将  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{NO}_2^-$  ,因此 ,间接检测  $\text{NO}_2^-$  的水平能有效用来反映 NO 的

水平<sup>[7]</sup> ,根据南京建成生物工程研究所提供的方法 ,用分光光度仪检测额叶和海马组织上清样品中 NO 的含量 ,结果以 nmol/mg · pro 来表示。

1.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS 11.0 统计软件处理 ,采用 student's *t* 检验两组间各项指标的差异 ,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

2 结 果

2.1 体重变化 建模前后体重增加量在两组间差异明显 ,模型组体重增加少于对照组(  $P = 0.000$  ) ,见表 1。

表 1 建模前后体重比较(  $\bar{x} \pm s$  )

Table 1 Changes of body weight in rats before and after modeling

| 组 别      | <i>n</i> | 应激前体重          | 应激后体重          | 体重增加量          |
|----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| 对照组      | 8        | 295.94 ± 22.46 | 424.12 ± 26.84 | 128.19 ± 18.22 |
| 模型组      | 8        | 290.88 ± 17.41 | 371.62 ± 14.25 | 80.75 ± 13.38  |
| <i>P</i> |          | 0.622          | 0.000          | 0.000          |

2.2 蔗糖消耗变化 从绝对蔗糖消耗比较来看 ,应激前后分别为( 82.31 ± 10.08 )g 和( 70.81 ± 13.59 )g ,差异没有统计学意义(  $P = 0.060$  ) ,因不同体重的大鼠对蔗糖的需要量各异 ,于是我们统计时采用绝对消耗与体重比的方法来比较 ,模型组大鼠应激后相对蔗糖消耗

量[ ( 0.19 ± 0.04 )g/kg ]少于应激前[ ( 0.28 ± 0.03 )g/kg ] ,差异有非常显著性意义(  $P = 0.001$  )。

2.3 行为学变化 2 组动物在建模前各项计分差异均不明显 ,慢性应激后模型组大鼠各项得分均明显少于对照组 ,见表 2。

表 2 2 组应激前后行为学变化( 次  $\bar{x} \pm s$  )

Table 2 Changes of ethology in rats before and after stress

| 组 别      | <i>n</i> | 应激前           |              |               | 应激后            |              |                |
|----------|----------|---------------|--------------|---------------|----------------|--------------|----------------|
|          |          | 水平得分          | 垂直得分         | 总得分           | 水平得分           | 垂直得分         | 总得分            |
| 对照组      | 8        | 61.25 ± 11.21 | 12.12 ± 2.36 | 73.38 ± 11.30 | 37.62 ± 18.31  | 6.12 ± 2.42  | 43.75 ± 19.88  |
| 模型组      | 8        | 52.12 ± 14.98 | 11.50 ± 5.88 | 63.62 ± 18.72 | 20.00 ± 10.88* | 2.62 ± 1.60* | 22.62 ± 12.26* |
| <i>P</i> |          | 0.189         | 0.786        | 0.228         | 0.034          | 0.004        | 0.023          |

与相应的对照组比较 ,\*  $P < 0.05$

2.4 两组大鼠各脑区 NO 含量的变化 模型组大鼠额叶和海马中 NO 含量[ 分别为( 31.00 ± 2.55 )和( 38.11 ± 1.73 )nmol/mg · pro ]均显著高于对照组[ 分别为( 26.97 ± 1.38 )和( 36.06 ± 0.87 )nmol/mg · pro ] ,差异具有统计

学意义(  $P < 0.05$  )。

3 讨 论

我们的实验采用慢性轻度应激和分养两种经典模型结合的方式 ,造成动物的抑郁状态。

慢性刺激可引起动物嗜好行为的变化,蔗糖溶液消耗量反映大鼠对奖赏的反应程度,本研究显示消耗量减少提示了大鼠兴趣丧失、快感缺乏,激箱实验得分反映了大鼠中枢神经系统兴奋性的高低,其中水平得分反映大鼠的活动度,垂直得分反映大鼠探究行为和好奇程度,本研究模型组大鼠各项得分较对照组明显降低,也反映了反复应激可能让大鼠处于了抑制状态;另外,研究也提示了模型组大鼠体重增长明显缓慢,这与临床上抑郁症患者的体重变化具有一致性,可作为动物模型量化的躯体症状,以上这些验证指标为深入研究抑郁发病机理提供了实验平台。普遍认为<sup>[5-6]</sup>,慢性应激抑郁模型经历了多种低强度刺激,其病因和病理机制比其它模型更接近于人类抑郁症,这与抑郁症临床诊断中的精神运动改变有一定程度的相似性,提示该模型是较理想的抑郁动物模型。

目前,抑郁症的发病机制主要被认为是由于患者体内 5-羟色胺、去甲肾上腺素和多巴胺等神经递质紊乱所致。我们的实验观察到慢性应激可引起大鼠额叶和海马 NO 产生明显增加,这与 Suzuki<sup>[8]</sup>等监测抑郁患者的结果一致,抑郁发作期患者代表血浆 NO 水平的亚硝酸盐水平明显高于缓解期。NO 作为一种新型信使分子,不仅参与病毒、细菌及肿瘤细胞等的杀伤,也能调节神经递质释放和脑血流,还参与神经发育和基因表达调控等多种生理过程<sup>[1]</sup>。研究中 NO 升高的原因可能与慢性应激激活下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴,糖皮质激素持续高分分泌以及脑内兴奋性氨基酸含量增多有关,一方面,葡萄糖代谢障碍直接导致神经细胞生存能力下降;另一方面,谷氨酸等兴奋性氨基酸作用于 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体,Ca<sup>2+</sup>内流导致细胞内浓度过高并与钙调蛋白结合于 NOS 相应位点,激活诱导型 NOS(iNOS),催化 L-精氨酸为瓜氨酸,引起包括脑组织在内的广泛组织 NO 的产生增加,产生的 NO 可迅速与临近部位的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)结合,催化 GTP 转化为 cGMP,后者又介导蛋白质的磷酸化反应产生各种生理病理效应,从而导致抑郁。另外,NO 及其代谢物还可能影响其它多种神经递质如 5-羟色胺、多巴胺的释放<sup>[2]</sup>,而目前大多抗抑郁药物的作用途

径恰与这些神经递质密切相关。不少学者反过来用相关药物也作了一些动物实验,研究发现一些抑制 NO-sGC-cGMP 通路 NOS 抑制剂和 NMDA 受体拮抗剂<sup>[9-10]</sup>,在应激所致抑郁中起着神经保护作用,提示这些药物可能具有抗焦虑抑郁作用。有趣的是,一些抗抑郁药物可影响 NOS 的表达和活性<sup>[11-14]</sup>;Finkel<sup>[14]</sup>就发现帕罗西汀除了选择性抑制 5-羟色胺再摄取外,还抑制 NOS 的活性,使 NO 的产生明显减少。于是推论,目前的抗抑郁药物通过作用于 5-羟色胺后,最终可能还要作用于各种 NOS,从而发挥抗抑郁作用,抗抑郁药物疗效的滞后性也就可能与这个有关。Luo 教授<sup>[13]</sup>的实验正支持了这一假说,他们证实抗抑郁药氟西汀能够通过抑制 NOS 的表达而降低抑郁模型大鼠海马神经元的萎缩,而这些神经元的修复正需要较长一段时间。这些结果从正反两方面提示 NO 可能参与了抑郁的病理机制。本研究的结果不仅支持了这一推测,并提示额叶和海马区在这一过程中可能参与了重要作用,但其间的确切关系及可能的机制尚待进一步研究,对 NO 生物合成与释放进行干预将为临床抑郁症的治疗提供新的思路。

References :

[ 1 ] SZABO C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system [ J ]. **Brain Res Bull** ,1996 ,41( 3 ) :131 - 141.

[ 2 ] KISS J P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission [ J ]. **Brain Res Bull** ,2000 ,52( 6 ) :459 - 466.

[ 3 ] MA Wen - tao ,YANG Lai - qi ,YANG Xi - min et al( 马文涛,杨来启,杨喜民,等 ). Change of nitric oxide and nitric oxide synthase in brain of rats induced by acute stress [ J ]. **Chinese Mental Health Journal**( 中国心理卫生杂志 ) ,2002 ,16( 6 ) :380 - 381.( in Chinese )

[ 4 ] MOGHADDAM B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex :implications for dopamine - associated psychiatric disorders [ J ]. **Biol Psychiatry** ,2002 ,51( 10 ) :775 - 787.

[ 5 ] XU Jing ,LI Xiao - qiu( 许晶,李晓秋 ). The establishment and evaluation of chronic unpredictable mild stress depression model [ J ]. **Chinese Journal of Behavioral Medical Science**( 中国行

- 为医学科学) 2003, 12(1): 14-17. (in Chinese)
- [6] WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation [J]. **Psycho-pharmacology**, 1997, 134(4): 319-329.
- [7] SALTER M, DUFFY C, GARTHWAITE J, et al. Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo [J]. **J Neurochem**, 1996, 66(4): 683-690.
- [8] SUZUKI E, YAGI G, NAKAKI T, et al. Elevated plasma nitrate levels in depressive states [J]. **J Affect Disord** 2001, 63(1-3): 221-224.
- [9] VOLKE V, WEGENER G, BOURIN M, et al. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice [J]. **Behav Brain Res** 2003, 140(1-2): 141-147.
- [10] HARKIN A, CONNOR T J, WALSH M, et al. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors [J]. **Neuropharmacology** 2003, 44(5): 616-623.
- [11] SUZUKI E, NAKAKI T, SHINTANI F S, et al. Antipsychotic, antidepressant, anxiolytic, and anticonvulsant drugs induce type II nitric oxide synthase mRNA in rat brain [J]. **Neurosci Lett** 2002, 333(3): 217-219.
- [12] WEGENER G, VOLKE V, HARVEY B H, et al. Local, but not systemic, administration of serotonergic Antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity [J]. **Brain Res** 2003, 959(1): 128-134.
- [13] LUO L, TAN R X. Fluoxetine inhibits dentritic atrophy of hippocampal neurons by decreasing nitric oxide synthase expression in rat depression model [J]. **Acta Pharmacol Sin** 2001, 22(10): 865-870.
- [14] FINKEL M S, LAGHRISSE T F, POLLOCK B G, et al. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor [J]. **Psychopharmacol Bull**, 1996, 32(4): 653-658.

[责任编辑 张荣连]

(上接第133页)

- [8] ZHANG Li-san, MA Yuan-ying, LI Qing, et al. (张力三, 马袁英, 李青等). Effects of endogenous histamine on memory impairment induced by pentylenetetrazole-kindled epilepsy in rats [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences** (浙江大学学报: 医学版) 2006, 35(6): 630-634. (in Chinese)
- [9] ATAPOUR N, KALANTARIPOUR T P, NOUR-PANAH M, et al. Chemical kindling and seizure susceptibility in morphine dependent rats [J]. **Eur Neuropsychopharmacol** 2000, 10: 483-487.
- [10] HOMAYOUN H, KHAVANDGAR S, DEHPOUR A R. The role of  $\alpha 2$ -adrenoceptors in the modulatory effects of morphine on seizure susceptibility in mice [J]. **Epilepsia** 2002a, 43(8): 797-804.
- [11] SHAFAROODI H, SAMINI M, MOEZI L, et al. The interaction of cannabinoids and opioids on pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice [J]. **Neuropharmacology** 2004, 47: 390-400.
- [12] CHEN Z, LI W D, ZHU L J, et al. Effects of histidine, a precursor of histamine, on pentylenetetrazole-induced seizures in rats [J]. **Acta Pharmacol Sin** 2002, 23(4): 361-366.
- [13] KAMEI C. Involvement of central histamine in amygdaloid kindled seizures in rats [J]. **Behav Brain Res** 2001, 124(2): 243-250.
- [14] CHRISTIAN B, ETIENNE Q, CHRISTELLE A, et al. The psychostimulant and rewarding effects of cocaine in histidine decarboxylase knockout mice do not support the hypothesis of an inhibitory function of histamine on reward [J]. **Psychopharmacology** 2006, in press.

[责任编辑 张荣连]