

叶酸对 PCPA 抑郁小鼠外侧缰核 β -CaMK II 水平的影响

高良才*, 刘鑫男, 李蔚然, 边靖文, 张 燕, 刘锦频

华东师范大学生命科学学院, 上海 200241

摘要:为探究叶酸对 PCPA 抑郁症模型小鼠的干预作用及其对外侧缰核 β -CaMK II 水平的影响, 将昆明种小鼠 40 只随机分为三组: 对照组、模型组、叶酸组, 通过腹腔注射 PCPA (100 mg/kg) 每日 1 次, 连续 4 d 构建抑郁症模型, 旷场与悬尾实验观察小鼠行为变化, HPLC 检测小鼠下丘脑 5-HT 含量, 免疫组化测定小鼠外侧缰核 β -CaMK II 表达水平。结果显示, 模型组与对照组相比自主活动能力下降, 悬尾不动时间延长 ($P < 0.05$), 而叶酸组与对照组相比上述实验结果无统计学差异 ($P > 0.05$)。模型组与对照组相比下丘脑 5-HT 含量降低, 外侧缰核 β -CaMK II 表达水平下降 ($P < 0.05$)。结果表明叶酸能显著提高下丘脑 5-HT 含量与外侧缰核 β -CaMK II 水平, 其抗抑郁作用机制可能与之有关。

关键词: 叶酸; 抑郁症; PCPA; β -钙调蛋白激酶

中图分类号: R749.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.021

Effects of Folic Acid on the Level of β -CaMK II in Lateral Habenular Nucleus of PCPA Depression Mice

GAO Liang-cai*, LIU Xin-nan, LI Wei-ran, BIAN Jing-wen, ZHANG Yan, LIU Jin-pin

East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract: To assess the effects of folic acid and the levels of β -CaMK II in lateral habenular nucleus of PCPA depression mice. 40 Kunming mice were randomly divided into control group, model group and folic acid group. The mice were intraperitoneally injected by PCPA once a day over a period of 4d to construct depression model. Then the changes in behaviors were observed. The level of 5-HT in the hypothalamus was detected by HPLC and the expression of β -CaMK II in the lateral habenular nucleus was verified by immunohistochemistry. Compared with model group, the locomotor activity was significantly increased ($P < 0.05$) and the immobility time of tail suspension was obviously reduced in folic acid treatment groups ($P < 0.05$). The level of 5-HT in the hypothalamus was detected by HPLC and the expression of β -CaMK II in the Lateral habenular nucleus were significantly decreased ($P < 0.05$). The results indicated that folic acid can significantly increase hypothalamus 5-HT and lateral habenular nucleus β -CaMK II, which could be the mechanism of anti-depressant effect of folic acid.

Key words: folic acid; depression; PCPA; β -CaMK II

抑郁症属于一种临床常见综合征, 全世界目前约 2 亿左右患者, 在致残性疾病中位于榜首。抑郁症病因十分复杂, 涉及到交感神经、内分泌和免疫系统等多个方面^[1]。单胺类神经递质假说认为抑郁症的生物学基础是 5-羟色胺 (5-HT) 和/或去甲肾上腺素 (NE) 的利用缺陷。目前, 许多治疗抑郁症的药物中都是各种阻断 5-HT、NE 代谢和重吸收的化合

物^[2]。近年研究表明, 钙调蛋白激酶家族成员中的 β -钙调蛋白激酶 II (β -CaMKII) 是导致外侧缰核过度活跃与抑郁行为表现状况的决定性分子^[3]。

叶酸是 B 族维生素的一种, 因从菠菜中发现, 故被命名为叶酸。叶酸富含于新鲜的水果、蔬菜、肉类食品中, 与人的精神活动密切相关。研究证实高达 35% ~ 92.6% 抑郁症的发病可能与叶酸缺乏有关^[4,5], 目前对于其抗抑郁的效果和机制尚不清晰。本实验采用 PCPA 抑郁小鼠模型探讨叶酸的抗抑郁效果及其对下丘脑 5-HT 含量与外侧缰核 β -CaMK II 水平的影响。

收稿日期: 2017-04-18

接受日期: 2017-05-15

基金项目: 上海市科委科研基金 (16DZ2348900); 国家大学生创新项目资助

* 通信作者 E-mail: lcgao@bio.ecnu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性昆明种小鼠 40 只, 体重 30 ~ 40 g, 清洁级(复旦大学实验动物科学部)。许可证号: SCXK(沪) 2009-0019。领取小鼠后饲养于动物房中, 适宜的恒温、恒湿饲养, 提供充足的食物和水。先饲养一周适应环境, 再根据适应后的体重以及旷场试验得分, 对小鼠进行评估, 分为基本无差异的三组, 对照组、模型组、叶酸组。

1.2 主要试剂与amp;仪器

对氯苯丙氨酸(PCPA)(梯希爱化成工业发展有限公司); 叶酸(国药集团化学试剂有限公司); 一抗液(武汉三鹰生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗液(武汉三鹰生物技术有限公司); PBS; PBST; 二甲基亚砜(DMSO); 戊巴比妥钠; 水合氯醛; 甲醛; 乙醇; 生理盐水; 高氯酸; 甲醇; 冰醋酸; 二甲苯; 苏木素; 伊红; 过氧化氢; DAB; 树脂等。EL204 电子天平; open-field 观察箱(成都泰盟科技有限公司产品); TS200 悬尾测试仪(成都泰盟科技有限公司产品); 包埋机; 石蜡切片机; 烤片机; 匀浆器; 漩涡振荡器; 冷冻离心机; C₁₈ 色谱柱; 高效液相色谱仪; 显微镜等。

1.3 模型的建立

参考文献^[6,7], 建立 PCPA 抑郁模型。模型组小鼠腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA, 5-羟色胺合成抑制剂, 100 mg/kg) 建模, 每日 1 次, 连续 4 d。建模完成后, 进行叶酸灌胃(75 mg/kg), 灌胃 1 次。

1.4 旷场试验

采用长 50 cm 宽 50 cm 高 40 cm 的方盒, 底部平均划分为 25 个方格, 将单只小鼠放入方盒中央, 记录 3 min 内的水平得分与垂直得分(水平得分: 小鼠至少三足同时进入另一格为水平运动得一分; 垂直得分: 双前肢离地为垂直运动得一分)。

1.5 悬尾实验

取用实验小鼠, 用医用胶带将小鼠尾巴粘在带有吸铁石的短铁棍上, 使小鼠头部朝下悬挂于一黑色背景的铁盒中前, 头部离地面约 3 cm。实验时先将小鼠悬挂木棍上适应 2 min 后, 再记录 4 min 内小鼠的不动时间。

1.6 下丘脑中 5-HT 含量测定

(1) 下丘脑样品制备: 小鼠脱颈椎处死后, 迅速断头、剥脑, 冰上分离下丘脑组织, 精密称重, 加入

0.4 mol/L 高氯酸溶液(组织: 高氯酸 = 1: 10) 制备匀浆, 匀浆经 4 °C, 离心 15 min(10000 rpm), 取上清-70 °C 保存。(2) 高效液相色谱法检测 5-HT: 称取标准品 2.1 mg 5-HT, 用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液溶解, 并分别定容至 10 mL, 分别依次稀释 250、500、1250、1500、1750、2000、2500、2750 倍, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清 HPLC 分析。以吸收峰峰高值对含量(ng) 作线性回归, 计算递质的回归方程, C₁₈ 柱, 流动相: 0.1 mol/L NaAc/ 甲醇: 9: 1, 高压泵流速 1.0 mL/min, 柱温室温, 进样量: 100 μL。

1.7 外侧缰核 β-CaMKII 表达水平测定

处死小鼠后, 每组取 5 只剥脑固定, 用 0.1 M PBS 洗去甲醛, 用 50%、75%、85%、95%、100% 的乙醇进行组织脱水, 用二甲苯进行组织通透, 65 ~ 70 °C 组织浸蜡过夜后进行包埋和切片。切片在 40 °C 温水中展平, 60 °C 烤片过夜后进行 HE 染色。染色后用二甲苯和 50%、75%、85%、95%、100% 的乙醇进行组织复水后进行抗原修复, 利用免疫组化细胞计数测定外侧缰核 β-CaMKII 表达水平。发生显色反应的阳性细胞呈棕黄色, 其计数方法参照 Molin 法^[8] 高倍镜下每只小鼠随机观察 10 个外侧缰核组织视野, 计数各视野内阳性细胞数, 求其均值为该组小鼠外侧缰核阳性细胞数。

1.8 统计学分析

实验数据均用 Sigma Plot 10.0 统计软件进行分析。数据表示为 $\bar{x} \pm SE$, 用 *P* 值比较组间的显著性差异。

2 实验结果

2.1 叶酸对小鼠行为学指标影响^[9]

模型组在旷场试验水平, 垂直, 总活动次数中均明显小于对照组(*P* < 0.05), 灌胃叶酸后, 叶酸组在旷场试验水平, 垂直, 总活动次数中明显高于模型组(*P* < 0.05)。模型组悬尾不动时间明显小于对照组(*P* < 0.05), 灌胃叶酸能够显著改善此变化(*P* < 0.05)(图 1)。

2.2 叶酸对小鼠下丘脑内 5-HT 含量的影响

模型组下丘脑 5-HT 含量明显低于对照组(*P* < 0.05), 叶酸组下丘脑 5-HT 含量与模型组相比显著上升(*P* < 0.05)(图 2)。

2.3 叶酸对小鼠外侧缰核 β-CaMKII 水平的影响

对照组小鼠外侧缰核部分细胞着色较深, 染色明显(图 3A); 模型组小鼠外侧缰核细胞染色较浅,

呈阳性反应的区域较少(图 3B);叶酸组小鼠外侧缰核细胞染色极深,阳性反应明显(图 3C)。说明模型组小鼠外侧缰核 β -CaMK II 表达量较对照组明显下

调,灌胃叶酸后, β -CaMK II 表达量显著上升,叶酸组 β -CaMK II 表达量与对照组无明显差别(图 3)。

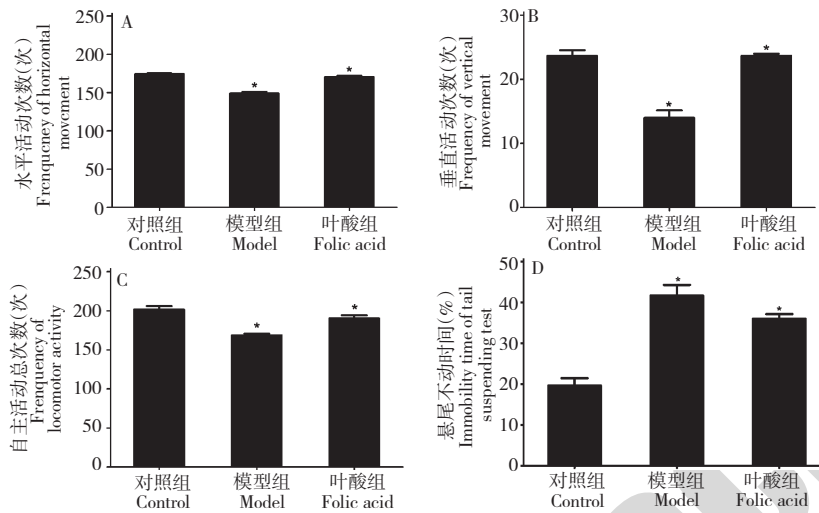


图 1 叶酸对小鼠自主活动次数及悬尾不动时间影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of folic acid on the locomotor activity and the immobility time of tail suspending test ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:A:叶酸对小鼠旷场水平活动次数的影响;B:叶酸对小鼠旷场垂直活动次数的影响;C:叶酸对小鼠旷场自主活动总次数的影响;D:叶酸对小鼠悬尾不动时间的影响。与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note:A:Effect of folic acid on the frequency of horizontal movement in open-field test;B:Effect of folic acid on the frequency of vertical movement in open-field test;C:Effects of folic acid on the locomotor activity;D:Effects on the immobility time of tail suspending test. Compared with the control group,* $P < 0.05$;Compared with the model group,* $P < 0.05$

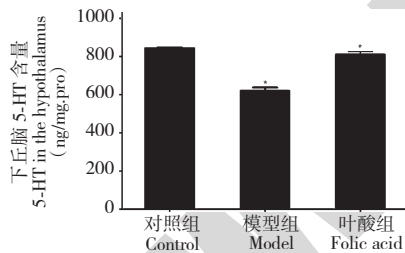


图 2 叶酸对小鼠下丘脑 5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of folic acid on the level of 5-HT in the hypothalamus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note:Compared with the control group,* $P < 0.05$;Compared with the model group,* $P < 0.05$

3 讨论

叶酸(盐)是维持机体正常生长发育所需的一类同效维生素,主要来源于蔬菜和谷物,马铃薯、橘子和草莓是叶酸的最好来源。叶酸以辅酶或辅助因子的作用参与机体中大量的生化反应:调控基因表达、维护并与修补基因组、调节神经递质合成等。研

究显示,约有三分之一的抑郁患者明显缺乏叶酸;而血清中叶酸浓度较低的或饮食中缺乏叶酸的人,其抑郁的发病率明显更高,是普通人群的 1.4 倍。本实验采用腹腔注射 PCPA 建立抑郁模型,利用旷场试验,强迫游泳实验评价小鼠的抑郁情绪^[10,11],结果发现,PCPA 模型组小鼠自主活动次数显著下降,悬尾不动时间明显上升,抑郁情绪加剧。灌胃叶酸后,小鼠自主活动显著上升,抑郁情绪得到明显缓解,提示叶酸对于抑郁小鼠的自主活动能力及抑郁情绪有一定缓解作用。

单胺类神经递质假说认为 5-HT 与去甲肾上腺素的利用缺陷是抑郁症的生物学基础。5-HT 的前体色氨酸在神经元内转化成 5-HT,因为只有神经元中才含有色氨酸羟化酶^[12],而催化此过程的色氨酸羟化酶需要四氢生物蝶呤作为辅助因子。叶酸能够通过提高四氢生物蝶呤的合成,促进 5-HT 的合成。研究发现叶酸的抗抑郁作用依赖于与 5-HT 和去甲肾上腺素系统的相互作用。同时,叶酸可能直接参与了抑郁症中 5-HT 功能的调节,叶酸缺乏与 5-HT 受损代谢相关^[12]。本实验结果表明,PCPA 模型组

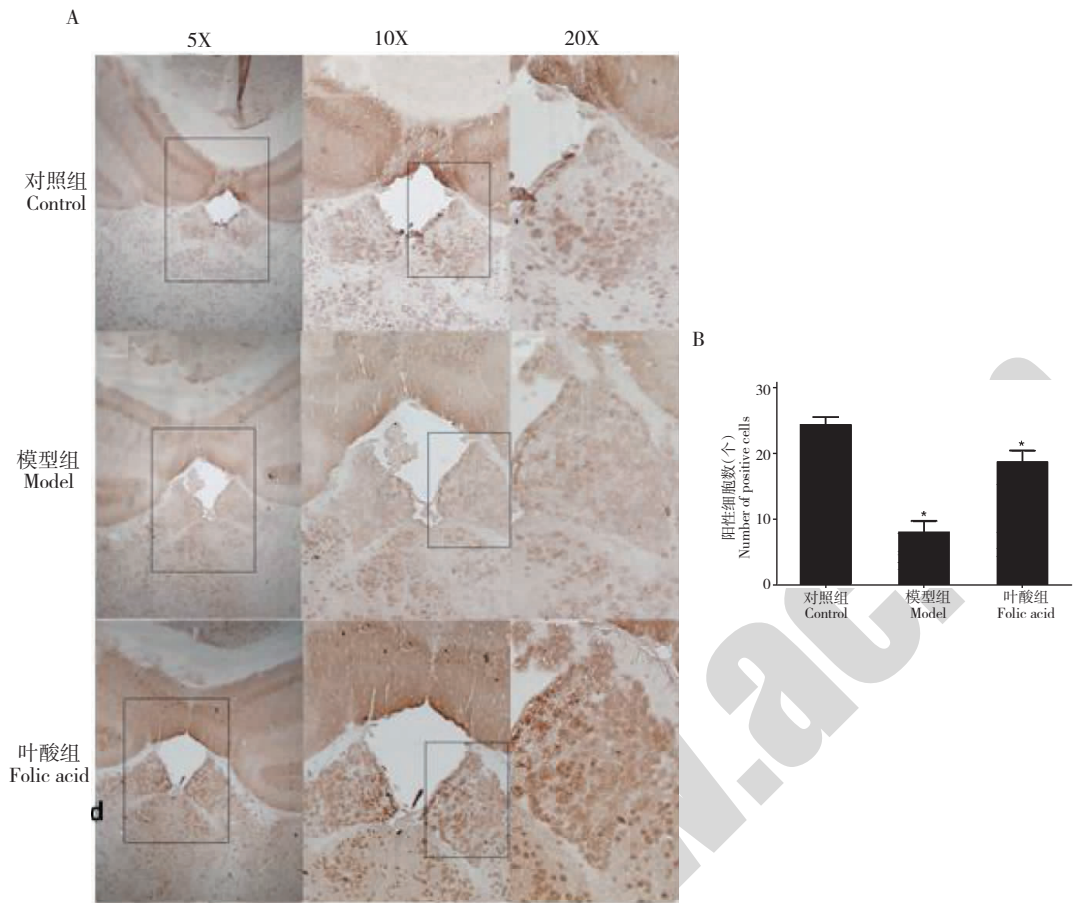


图3 叶酸对小鼠外侧缰核 β -CaMKII 水平影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of folic acid on the β -CaMKII in the Lateral habenular nucleus($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:A: β -CaMKII 免疫组化分布图;B: β -CaMKII 阳性细胞比例。与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$

Note: A: Immunohistochemistry of β -CaMKII; B: Number of positive numbers. Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, * $P < 0.05$

与对照组相比,下丘脑 5-HT 含量显著下降,说明抑郁样情绪与下丘脑 5-HT 含量下降有关。灌胃叶酸后,叶酸组下丘脑 5-HT 含量较模型组显著上升,与对照组无明显差异。提示叶酸抗抑郁的作用机制与其提高模型组下丘脑内 5-HT 含量有关。

当前脑边缘系统向下游各个单胺能中心传达信息时,需要通过外侧缰核的核心区域,根据抑郁动物模型以及神经影像学的研究,在抑郁状态下的缰核脑区比正常脑区表现得更为兴奋。因此外侧缰核与抑郁症发病机理密切相关。已有研究证明钙调蛋白激酶家族成员中的 β -CaMKII 是导致外侧缰核过度活跃,引起抑郁行为的决定性分子。本实验中,PC-PA 模型小鼠外侧缰核 β -CaMK II 表达量较对照组显著下降,灌胃叶酸后, β -CaMK II 表达量明显上升,并与对照组无显著差异。表明叶酸可通过提高

模型组外侧缰核 β -CaMK II 的表达来达到抗抑郁的效果。

综上所述,叶酸对于 PCPA 的抗抑郁作用与提高模型组下丘脑 5-HT 含量与外侧缰核 β -CaMKII 表达量有关。这为抑郁症的治疗提供一个新的方向。

参考文献

- 1 Opmeer EM, Kortekaas R, Aleman A. Depression and the role of genes involved in dopamine metabolism and signaling. *Prog Neurobiol*, 2010, 92: 112-133.
- 2 Chang HS (畅洪昇), Wang QG (王庆国), Shi RB (石任兵), et al. Effects of Sini powder on behavior and monoamine neurotransmitter in chronic stress model of depressive rats. *J Beijing Univ Traditi Chin Med* (北京中医药大学学报), 2003, 5: 42-45.
- 3 Li K, Zhou T, Liao L, et al. β CaMKII in lateral habenula medi-

- ates core symptoms of depression. *Science*,2013,341:1016-1020.
- 4 Xu Q (薛琴), Ma C (马聪). Research progress on the relationship between folic acid deficiency and depression. *People's Milit Surgeon* (人民军医),2013,4:465-466.
 - 5 Liang CW (梁承玮), Yu YZ (俞雅珍). Folic acid deficiency in children with central nervous system performance. *J Appl Clin Pediatrics* (实用儿科临床杂志),2010,7:469-472.
 - 6 Quan SJ (全世建), Lin XE (林杏娥), Liu N (刘妮), et al. Study on syndrome attributes of insomnia model in PCPA rats PCPA. *J Tradit Chin Med* (中医药学刊),2006,3:450-451.
 - 7 Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, et al. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*,2008,54:464-473.
 - 8 Molin D, Edstrom A, Glimelius I, et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*,2002,119:122-124.
 - 9 Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*,1985,85:367-370.
 - 10 Gao LC (高良才), Wang YT (王玉婷), Lao X (劳勋), et al. Changes of learning and memory ability in depression model rats. *J Molecul Cell Biol* (分子细胞生物学报),2009,1:20-26.
 - 11 Gao L (高良才), Zou LJ (邹丽娟), Zhang ZH (章志宏), et al. Study on depression induced by chronic injection of CRF in the lateral ventricle of rats. *J Molecul Cell Biol* (分子细胞生物学报),2009,2:95-100.
 - 12 Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*,2005,29:1103-1112.
-
- (上接第 1095 页)
- 12 Gualtieri M, Aumelas A, Thaler JO. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *J Antibiot*,2009,62:295-302.
 - 13 McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. , Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod*,1991,54:774-784.
 - 14 Li B, Wever WJ, Walsh CT, et al. Correction: Dithiopyrrolones: biosynthesis, synthesis, and activity of a unique class of disulfide-containing antibiotics. *Nat Prod Rep*,2015,32:348-349.
 - 15 Qin Z, Huang S, Yu Y, et al. Dithiopyrrolone natural products: isolation, synthesis and biosynthesis. *Mar Drugs*,2013,11:3970-3997.
 - 16 Jimenez A, Tipper DJ, Davies J. Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*,1973,3:729-738.
 - 17 Okamura K, Soga K, Shimauchi Y, et al. Holomycin and N-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot*,1977,30:334-336.
 - 18 Li B, Lyle MP, Chen G, et al. Substituted 6-amino-4h-[1,2] dithiolo[4,3-b] pyrrol-5-ones: synthesis, structure-activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer-cell lines. *Bioorg Med Chem*, 2007,15:4601-4608.
 - 19 Merrouche R, Bouras N, Coppel Y, et al. New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol Lett*,2011,318:41-46.
 - 20 Bi YH, Yu ZG. Diterpenoids from *Streptomyces* sp. SN194 and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem*,2016,64:8525-8529.
 - 21 Shi DS, An R, Zhang WB, et al. Stilbene derivatives from *Photorhabdus temperata* SN259 and their antifungal activities against phytopathogenic fungi. *J Agric Food Chem*,2017,65:60-65.
 - 22 Tian XM (田晓美), Lu XZ (卢星忠), Wang N (王宁), et al. Isolation and identification of secondary Metabolites from *Xenorhabdus bovienii* SN52. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2016,28:490-493
 - 23 Lu XZ (卢星忠), Shi DS (石丹姝), Gao CZ (高淳之), et al. Isolation and identification of secondary metabolites from *Xenorhabdus budapestensis* SN19. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2016,28:828-838.
 - 24 Sergeant M, Baxter L, Jarrett P, et al. Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *Appl Environ Microbiol*,2006,72:5895-5907.
 - 25 Shen CC, Syu WJ, Li SY, et al. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *J Nat Prod*,2002,65:1857-1862.
 - 26 Dang Q Le, Shin TS, Park MS, et al. Antimicrobial activities of novel mannosyl lipids isolated from the biocontrol fungus *Simplicillium lamellicola* BCP against phytopathogenic bacteria. *J Agric Food Chem*,2014,62:3363-3370.
 - 27 Merrouche R, Bouras N, Coppel Y, et al. Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod*,2010,73:1164-1166.